

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年7月26日 (26.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/53491 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/45, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/00087

(22) 国際出願日: 2001年1月11日 (11.01.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-14136 2000年1月19日 (19.01.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.)
[JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番
11号 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 真崎一郎

(MASAKI, Ichirou) [JP/JP]; 〒830-0038 福岡県久
留米市西町560-5 Fukuoka (JP). 米満吉和 (YONE-
MITSU, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒813-0043 福岡県福岡
市東区名島5-31-3 Fukuoka (JP). 居石克夫 (SUEISHI,
Katsuo) [JP/JP]; 〒815-0073 福岡県福岡市南区大
池1-29-22 Fukuoka (JP). 長谷川護 (HASEGAWA,
Mamoru) [JP/JP]. 喜納宏昭 (KINOH, Hiroaki) [JP/JP];
〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株
式会社 ディナベック研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[続葉有]

(54) Title: USE OF PARAMYXOVIRUS VECTOR IN GENE TRANSFER INTO BLOOD VESSEL

(54) 発明の名称: パラミクソウイルスベクターの血管への遺伝子導入用途

(57) Abstract: Use of a paramyxovirus vector makes it possible to transfer a nucleic acid into a blood vessel at a high efficiency even by exposing to the vector within a short period of time. Namely, a paramyxovirus vector to be used for transferring a nucleic acid into vascular cells and a nucleic acid transfer method with the use of this virus vector are provided. The gene transfer efficiency into the vascular media layer is significantly elevated by treating the blood vessel with a protease. The expression of the transferred gene remains stable over a long time in the vascular cells. Use of this method makes it possible to efficiently transfer a gene within a short period of time into the vascular cavity, media, tunica tissues, etc. in gene therapy.

(57) 要約:

組み換えパラミクソウイルスベクターを用いることにより、短時間のベクターの暴露でも血管へ高い効率で核酸を導入することが可能となった。本発明は、血管細胞へ核酸を導入するために用いるパラミクソウイルスベクターおよび該ウイルスベクターを用いる核酸の導入方法を提供する。血管をプロテアーゼで処理することにより、血管の中膜層への遺伝子導入効率が有意に上昇した。血管細胞での導入遺伝子の発現は長期間安定であった。本発明の方法を利用することにより、遺伝子治療等を行う際に、血管の管腔内、中膜、および外膜組織等へ短時間に効率よく遺伝子を導入することが可能となった。



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

パラミクソウイルスベクターの血管への遺伝子導入用途

技術分野

本発明は、パラミクソウイルスベクターの血管への遺伝子導入用途に関する。

背景技術

組換え遺伝子を血管壁においてインビボで発現させることが成功して以来 (Nabel, E. G. et al., Science 244: 1342-1344, 1989; Nabel, E. G. et al., Science 249: 1285-8, 1990)、遺伝子治療はヒトの血管疾患の治療法としての期待が高まり、種々のベクター系を使用した多くの検討が実施されてきた。しかしながら、安全性の問題に加え、遺伝子導入効率を含むいくつかの重要な制約のために、動物において成功したこれらの研究を臨床試験に移行するのは未だ難しい状況にある (DeYoung, M. B. et al., Circ. Res. 82: 306-313, 1998)。

例えばPTCA（経皮的冠動脈形成術）においては、狭窄部位でバルーンを拡張することにより狭窄を解除する。PTCAを受けた血管の30～40%は再狭窄をきたし、临床上大きな問題となっている。その再狭窄の主な原因は新生内膜の増殖と血管のre-construction（再構築）である。マクロファージが血管内膜へ浸潤し、動脈硬化で肥厚した新生内膜は主として中膜より遊走してきた血管平滑筋細胞と細胞外基質により構成される。遺伝子治療による再狭窄の阻止や動脈硬化の治療には、動脈への遺伝子導入が有効だが、既存のベクターやリポソーム法ではその導入率が低いことが知られている。治療の標的となるマクロファージは基底膜下の内膜に、血管平滑筋細胞は血管中膜に存在するが、マクロファージへの遺伝子導入は血管内皮細胞および基底膜という障壁が、平滑筋細胞への遺伝子導入はその2つに加えて弾性繊維という障壁が存在する。

組換えアデノウイルスベクターは、血管への遺伝子導入に最もよく使用されているベクターの1つで、遺伝子導入効率が比較的高いことが明らかにされているが、患者に適用するには、克服しなければならない幾つかの未解決の問題がある。組換えアデノウイルスは、動物 (Rome, J. J. et al., *Arterioscler Thromb.* 14: 148-161, 1994; Steg, P. G. et al., *Circulation* 90: 1648-1656, 1994) およびヒト (Rekhter, M. D. et al., *Circ. Res.* 82: 1243-1252, 1998) の損傷していない血管の内皮細胞 (endothelial cells; ECs) および外膜に、外来遺伝子を効率的にトランスフェクトすることができるものの、ウサギ (Feldman, L. J. et al., *J. Clin. Invest.* 95: 2662-2671, 1995) およびヒト (Rekhter, M. D. et al., *Circ. Res.* 82: 1243-1252, 1998) のアテローム性硬化巣および中膜層 (medial layer) へのアデノウイルスの取り込み率は比較的低く、静止期の細胞に対する遺伝子治療戦略におけるアデノウイルスの効力は制限される。実際、血管内側からアデノウイルスベクターを感染させても、その感染は主に血管内皮細胞のみに限局され、マクロファージや平滑筋細胞へはほとんど感染しない。そのため、動脈硬化などの病変の原因となる細胞に直接治療遺伝子を感染させることが困難な状況にある。さらに重要なことは、アデノウイルスを介した遺伝子導入は、最大の導入効率を得るためには比較的に長い暴露時間が必要であり (Feldman, L. J. et al., *J. Clin. Invest.* 95: 2662-2671, 1995)、これはコクサッキー-アデノウイルス受容体 (CAR) を介してベクター粒子が細胞内に取り込まれるためには、長時間の接触が必要であるためと考えられている。例えば、経皮経管的冠動脈形成術 (PTCA) の際に冠状動脈流を遮断できるのは数分間が限度であり、アデノウイルスベクターの臨床応用への大きな障害となると思われる。

アデノウイルスベクターが持つこのような問題に対して幾つかの方法が試みられている。1つはバルーンカテーテルなどにより血管内皮細胞を擦ることによって剥離し、ベクターの感染効率を高める方法、2つ目はバルーンカテーテルで擦った後、感染させるときに圧力をかける方法、最後にバルーンカテーテルで擦っ

た後に、エラスターゼによって組織表面を分解する方法である。しかし、これらの実験によっても感染率は十分ではなく、また、感染時間および圧をかける時間共に約30分以上という長時間を要している (Guzman, R. J. et al. (1993) *Circulation* 88, 2838-48; Maillard, L. et al. (1998) *Gene Ther* 5, 1023-30; Rekhter, M. et al. (1998) *Circ. Res.* 82, 1243-52; Rome, J. J. et al. (1994) *Hum. Gene Ther.* 5, 1249-58; Weeks, B. S. et al. (2000) *Arch. Virol.* 145, 385-96)。

センダイウイルス (Sendai virus; SeV, 別称 hemagglutinating virus of Japan ; HVJ) のエンベロープ蛋白質をコートしたリボソーム、すなわちHVJ-リボソームは比較的高い遺伝子導入効率を達成することが可能であり、本発明者らは、150 mmHgの注入圧、10分間のインビボ導入でウサギ頸動脈の中膜平滑筋細胞に80%以上の導入効率を得られることを報告している (Yonemitsu, Y. et al., *Lab. Invest.* 75: 313-323, 1996)。そのときの血管を電子顕微鏡により観察したところ、ベクター粒子は中膜層全体へ透過していたことから、中型動物の血管壁の透過性は比較的高いことが示唆される。本発明者らは、このベクター系を用いて、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) およびヒトサイトメガロウイルス前初期発現遺伝子 (Yonemitsu, Y. et al., *Lab. Invest.* 75: 313-323, 1996; Yonemitsu, Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 447-451, 1997) などの幾つかの遺伝子の過剰発現による血管異常のインビボ誘導、並びに内皮型恒常的NO合成酵素遺伝子 (Matsumoto, T. et al., *J. Vasc. Surg.* 27: 135-144, 1998) または野生型p53遺伝子 (Yonemitsu, Y. et al., *Circ. Res.* 82: 147-156, 1998) を用いた血管増殖性疾患のインビボ抑制を含むいくつかの検討を行った。しかし、本発明者らによる、ヒト疾患伏在静脈および冠動脈を使用した前臨床試験および予備的な実験の結果は、このベクターを介した遺伝子導入および発現の効率は、アデノウイルスを用いた以前の報告 (Feldman, L. J. et al., *J. Clin. Invest.* 95: 2662-2671, 1995) と同様に、十分なものではなかった。具体的には、HVJ-リボソ

ームによる新生内膜および中膜へのトランスフェクションは、1気圧の注入圧であつても表層の2〜3層に限られており、ベクター粒子の透過性が失われていることが示唆された。アデノウイルスやHVJ-リボソームを用いたこれらの結果は、ヒトの疾患血管壁には生物学的な障壁が存在することを示唆しており、これらの障壁を克服できるベクターの開発が望まれていた。

発明の開示

本発明は、短時間の接触で血管細胞に遺伝子を導入でき、導入された遺伝子が血管細胞内で持続的に発現しうるウイルスベクターおよびその用途を提供することを課題とする。より詳しくは、本発明は、血管細胞へ遺伝子導入するために用いるパラミクソウイルスベクターおよび該ベクターを利用して血管細胞へ遺伝子導入する方法を提供する。

本発明者らは、センダイウイルス（「SeV」と略す）のリバースジェネティクスの技術を用いて、遺伝子導入用の組換えセンダイウイルスベクターの開発に成功している（Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996; Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-587, 1997; Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997; Sakai, Y. et al., FEBS Lett. 456: 221-226, 1999; 国際公開97/16538号および国際公開97/16539号）。

そこで、この組換えセンダイウイルスベクターの血管に対する遺伝子導入の特性を解析すると共に、このベクターが現在の遺伝子導入ベクターが抱える障害を克服することができるかについて検討した。すなわち、（1）臨床を考慮した上で、トランスフェクション効率、遺伝子発現効率、遺伝子発現の持続性、およびベクター暴露時間の影響を含む、インビトロにおけるSeVのトランスフェクション活性を評価し、（2）下肢に静脈瘤を有する患者から外科手術により得られた病変を持つ大伏在静脈を用いて、ヒト血管におけるSeVの遺伝子導入能力およびトランスフェクションされる細胞種を検討した。

その結果、インビトロにおいて、ホタルルシフェラーゼを保持する組換えSeVが、増殖細胞および静止期の細胞のどちらにおいても、用量依存かつ持続的な遺伝子発現を示すことが判明し、1箇月以上に亘ってゲノムが安定であることが示唆された。また、培養細胞およびヒト静脈の双方において、僅かな時間の暴露だけで最大に近い遺伝子発現が得られることが判明した。病変を持つヒト大伏在静脈と、核標的化lacZ遺伝子をコードするSeVとを使用したエキスピボ実験によると、管腔内導入および単純なフロートの両方の導入方法において、管腔および血管の脈管 (vasa vasora) (血管壁栄養血管) の内皮細胞 (EC)、ならびに血管外膜の線維芽細胞 (adventitial fibroblast) に対して高いトランスフェクション効率を示した。

すなわち、本発明者らは、パラミクソウイルスベクターが、1) ベクター溶液の血管壁への短時間の暴露でも効率的な遺伝子導入に十分であり、2) ウイルスゲノムおよび外来遺伝子の発現は長期間安定であり、少なくともインビトロでは、1箇月以上は増殖中の細胞および静止期の細胞の両方において比較的安定であることを見出した。これらの結果は、血管への遺伝子導入研究の分野で有望な標準として使用されているアデノウイルスベクターとは明らかに対照的である。アデノウイルスベクターには、導入遺伝子の高発現と高い導入効率が細胞周期によらないなど、幾つかの重要な利点を有していることが示されているが、パラミクソウイルスベクターにおいてもそれらは共通している。このようなパラミクソウイルスベクターの特徴を考慮することにより、それぞれの臨床状況に応用するための血管へ遺伝子治療を確立することが可能となる。

ラット胸部動脈を用いたインビトロ器官培養での導入における感染効率を lacZ/Adenoウイルスベクター、および lacZ-SeV で比較した場合でも、lacZ-SeV の方が低いmoiでしかも短時間 (2分間) で血管内皮細胞へ高い感染を示した。このように、本発明のパラミクソウイルスベクターは、アデノウイルスベクターが持つ感染における時間的な制約を克服することが明らかとなった。

さらに本発明者らは、ベクターを投与する際に、基底膜、弾性繊維といった細胞外マトリクスをプロテアーゼで前処理して分解することによって、中膜への高効率での感染が可能となることを見出した。プロテアーゼ処理による血管中膜への遺伝子導入効率の向上は、プロテアーゼで処理後に本発明のベクターを感染させるときのみならず、プロテアーゼとベクターを混合して同時に処理することによっても認められた。特に、プロテアーゼとベクターを投与事前に混合し同時に投与することによって血管中膜層へ遺伝子導入できることは事前に想到し得ない事実であり、プロテアーゼ処理とベクターの感染操作を同時に実施可能であることを本発明者らは初めて明らかとした。ラット胸部動脈へのインビトロ器官培養での導入において、様々なプロテアーゼで前処理後、lacZ-SeV を感染させ、その効果を観察した結果、調べたいずれのプロテアーゼ前処理によっても lacZ-SeV の感染効率の上昇が認められた。特に、アデノウイルスベクターで効果が知られているエラスターゼ処理の効果に比べ、コラゲナーゼ処理、tPA 処理、および MMP9 処理の効果が顕著に高かった。切片を作製し、血管のどの細胞まで感染しているかを見ると、コラゲナーゼ処理、tPA 処理、および MMP9 処理において血管内皮細胞、基底膜を越えて、中膜の平滑筋細胞にまで感染していることが確認された。腹部大動脈に感染させるインビボでの実験では、インビトロと同様にコラゲナーゼ、tPA、MMP9 処理において中膜への感染が確認された。また、これらの一連のプロテアーゼ処理と感染操作は、7～9 分間またはそれ以下（例えば 5 分以内）に短縮可能であった。このように、本発明のベクターは従来困難であった中膜の細胞に感染することができ、血管への遺伝子導入における時間的な制約に加え、空間的な制約をも克服することができた。

従来、アデノウイルスベクターにおいて、バルーンカテーテルによる血管内皮細胞剥離、エラスターゼによる分解後のベクターの感染によってその感染効率を上昇させる研究が報告されているが (Maillard, L. et al. (1998) Gene Ther 5, 1023-30)、その感染効率は低く、特に平滑筋細胞への感染も低い。これに対して

本発明のベクターは感染効率が高く、標的となる細胞種も拡大した。短時間で感染するという本発明のパラミクソウイルスベクターとプロテアーゼ処理とを組み合わせることによって、より効率的に血管のマクロファージや平滑筋細胞に遺伝子を導入することも可能である。

即ち、本発明は、血管への遺伝子導入用パラミクソウイルスベクターおよびそれを用いた遺伝子導入方法に関し、より具体的には、

- (1) 組換えパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を血管細胞へ接触させる工程を含む、血管細胞へ核酸を導入する方法、
- (2) 下記 (a) および (b) に記載の工程を、(a) (b) の順または同時で行うことを含む、血管細胞へ核酸を導入する方法、
 - (a) 血管細胞を含む組織をプロテアーゼで処理する工程、
 - (b) 組換えパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を血管細胞へ接触させる工程、
- (3) プロテアーゼがコラゲナーゼ、ウロキナーゼ、エラスターゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、プラスミン、マトリックスメタロプロテイナーゼからなる群より選択される、(2) に記載の方法、
- (4) 組換えパラミクソウイルスベクターに含まれる核酸が外来遺伝子を含む、(1) から (3) のいずれかに記載の方法、
- (5) 血管細胞が血管内腔の内皮細胞、血管の脈管（血管壁栄養血管）の内皮細胞、血管中膜の血管平滑筋細胞、および外膜の細胞からなる群より選択される、(1) から (4) のいずれかに記載の方法、
- (6) パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、(1) から (5) のいずれかに記載の方法、
- (7) 血管細胞へ核酸を導入するために用いる、組換えパラミクソウイルスベクター、
- (8) パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、(7) に記載のベクター、

- (9) 組換えパラミクソウイルスベクターに含まれる核酸が外来遺伝子を含む、
(7) または (8) に記載のベクター、
(10) 血管細胞が血管内腔の内皮細胞、血管の脈管（血管壁栄養血管）の内皮細胞、血管中膜の血管平滑筋細胞、および外膜の細胞からなる群より選択される、(7) から (9) のいずれかに記載のベクター、
(11) (7) から (10) のいずれかに記載の組換えパラミクソウイルスベクターを含む、血管細胞への遺伝子導入用組成物、
(12) (7) から (10) のいずれかに記載の組換えパラミクソウイルスベクターおよびプロテアーゼを含む、血管細胞への遺伝子導入用キット、
(13) プロテアーゼがコラゲナーゼ、ウロキナーゼ、エラスターゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、プラスミン、マトリックスメタロプロテイナーゼからなる群より選択される、(12) に記載のキット、に関する。

本発明において「パラミクソウイルスベクター」とは、パラミクソウイルスに由来し遺伝子を宿主細胞に導入するベクター（担体）を指す。本発明のパラミクソウイルスベクターはRNPであってもよく、また、感染力を持つウイルス粒子であってもよい。ここで「感染力」とは、パラミクソウイルスベクターが細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、接着した細胞の内部にベクター内部の遺伝子を導入することのできる能力を言う。好ましい態様では、本発明のパラミクソウイルスベクターは、外来遺伝子を発現することができるように保持する。本発明のパラミクソウイルスベクターは、複製能を有していてもよく、複製能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「複製能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

本明細書において、「組み換え」パラミクソウイルスベクターとは、遺伝子操作により構築されたパラミクソウイルスベクターまたはそれを増幅して得られるパラミクソウイルスベクターを言う。組み換えパラミクソウイルスベクターは、例

えば、組み換えパラミクソウイルスcDNAを再構成して生成することができる。

本発明においてパラミクソウイルスとはパラミクソウイルス科に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明を適用可能なパラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科(*Paramyxoviridae*)のセンダイウイルス(*Sendai virus*)、ニューカッスル病ウイルス(*Newcastle disease virus*)、おたふくかぜウイルス(*Mumps virus*)、麻疹ウイルス(*Measles virus*)、RSウイルス(*Respiratory syncytial virus*)、牛痘ウイルス(*rinderpest virus*)、ジステンパーウイルス(*distemper virus*)、サルバラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1,2,3型等が挙げられる。本発明のウイルスは、好ましくはパラミクソウイルス属 (*Paramyxovirus*) に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なパラミクソウイルス属ウイルスとしては、例えばセンダイウイルス(*Sendai virus*)およびヒトHA2などを含むパラインフルエンザウイルス1型、サルSV5およびSV41並びにヒトCAなどを含むパラインフルエンザウイルス2型、ウシSFおよびヒトHA1などを含むパラインフルエンザ3型、パラインフルエンザ4型(A亜型およびB亜型を含む)、ムンプスウイルス、ニューカッスルウイルス、並びにその他の多くのパラミクソウイルス属ウイルスが含まれる。本発明のパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子 (J. Virol. 68, 8413-8417(1994)) 等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、本発明のウイルスベクターを製造するための材料として使用することができる。

パラミクソウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子が挙げられる。「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に

次のように表記される。一般に、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある。

パラミクソウイルス属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルブラウイルス属	NP	P/V	M	F	HN (SH)		L
モービリウイルス属	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のレスピロウイルス (Respirovirus) に分類されるセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886を参照のこと。

本発明において「遺伝子」とは遺伝物質を指し、RNAおよびDNA等の核酸が含まれる。遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。人工的な蛋白質としては、例えば、他の蛋白質との融合蛋白質、ドミナントネガティブ蛋白質 (受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む)、欠失型の細胞接着分子および可溶性細胞表面分子などの形態であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。

また、「血管細胞」とは、血管を構成する細胞を指し、内膜 (管腔)、中膜、外膜、血管の脈管の細胞等が含まれる。これらの細胞には、内皮細胞、平滑筋細胞、および線維芽細胞等が含まれる。

本発明は、組換えパラミクソウイルスベクターの血管細胞へ遺伝子導入用途を提供する。本発明者等は、センダイウイルスが、短時間の接触で血管細胞へ遺伝子を導入することができることを見出した。本発明者等による実験では、遺伝子

導入後わずか1時間で有為な血管細胞内での遺伝子発現が検出され、発現レベルは時間依存的に対数的に増加した。また、本発明のベクターは血管細胞への極めて短時間（数分間）の接触でも、十分な感染効率を示した。この事実は、例えば、経皮経管的冠動脈形成術（PTCA）部位の動脈の管腔内へ遺伝子導入を行う際に、組換えパラミクソウイルスを用いれば、遺伝子導入のための血流の遮断が短時間で済む点という利点をもたらす。グズマン（Guzman）らはインビトロの研究により、lacZを保持するアデノウイルスベクターは、5分の暴露では血管平滑筋細胞（VSMC）の25%にトランスフェクトされ、120分の暴露でも80%にしかトランスフェクトされないことを報告している（Guzman, R. J. et al., Circulation 88: 2838-2848, 1993）。このことは、BSMCを用いた本発明者らの実験においても代表的に観察された（図8）。これはPTCAへの応用にとって実際上の問題であることから、ECを標的とした遺伝子導入において、組換えパラミクソウイルスであればこれを解決することができることを示唆する。

また、本発明者等により、組換えセンダイウイルスベクターを利用して血管細胞に導入されたが遺伝子が少なくとも1箇月以上持続的な発現を示すことが示された。このことは、組換えパラミクソウイルスベクターを利用して、血管細胞を標的とした遺伝子治療を行なった場合に、持続的な治療効果を得ることができるという利点をもたらす。

また、安全性の面においても、センダイウイルスベクターはヒトへの遺伝子治療の臨床試験に好適に用いられうる可能性が示唆される。第一に、外来遺伝子の発現は、多くの場合、導入したDNAの核局在化が必要であることが、遺伝子導入の成功率を低下させる主要な障害になっている。しかし、センダイウイルスなどの場合、外来遺伝子の発現は、細胞質内において細胞性チューブリンおよび自身が持つRNAポリメラーゼ（L蛋白質）の両方によって駆動される。これはまた、センダイウイルスが宿主のゲノムと相互作用しないことを示しており、癌化などの安全面における問題が生じないと考えられる。第二に、センダイウイルスは齧歯類

にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、人には病原性ではない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている (Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。センダイウイルスのこれらの特徴は、センダイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用しうることを示唆し、センダイウイルスベクターが、血管壁への遺伝子治療の有望な選択肢の1つとなることを結論づけるものである。

このようにパラミクソウイルスベクターが血管細胞への遺伝子導入において様々な利点を有するという本発明により得られた知見は、特に、血管細胞を標的とした遺伝子治療などにおいて大きな進歩をもたらす可能性があるといえる。すなわち本発明は、血管細胞へ核酸を導入するために用いる組換えパラミクソウイルスベクター、および該ベクターを用いて血管細胞に核酸を導入する方法に関する。また本発明は、組み換えパラミクソウイルスベクターの血管細胞へ核酸を導入するための使用を提供する。

本発明において血管細胞への遺伝子導入に用いる組換えパラミクソウイルスベクターとしては、特に制限はない。好適な組換えパラミクソウイルスベクターとして、例えば、複製能を有し、自立的に増殖するようなベクターが挙げられる。例えば、一般に天然型パラミクソウイルスのゲノムは、3'の短いリーダー領域に続き、N (ヌクレオキャプシド)、P (ホスホ)、M (マトリックス)、F (フュージョン)、HN (ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ)、およびL (ラージ) 蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5'トレイラー領域を他端に有する。これと同様の構造を有するゲノムを設計することにより、自律複製可能な本発明のベクターを製造することができる。また、ゲノム内に外来遺伝子を挿入することにより、外来遺伝子を発現するベクターを製造することができる。なお、本発明のパラミクソウイルスベクターにおいては、ウイルス遺伝子の配置は野生型ウイルスから改変されていてもよい。

また、本発明に用いる組換えパラミクソウイルスベクターとしては、野生型パラミクソウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってもよい。例えば、センダイウイルスベクターを再構成させる場合、NP、P/CおよびL遺伝子から作られる蛋白質群がトランスに必要なと考えられているが、該蛋白質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要はない。例えば、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する発現ベクターを、ベクターゲノムをコードする発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ベクターの再構成を行うことができる。また、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞にベクターゲノムをコードする発現ベクターを導入し、該宿主細胞から該蛋白質群を供給して再構成を行ってもよい。これらの蛋白質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、パラミクソウイルスベクターが細胞に伝播してゆくためには、M、FおよびHN遺伝子から作られる蛋白質群が必要だと考えられているが、パラミクソウイルスベクターをRNPとして調製する場合は、これらの蛋白質は必要ない。RNPに含まれるゲノムに、M、FおよびHN遺伝子が含まれていれば、宿主に導入された時に、これらの遺伝子産物が生産され、感染性のあるウイルス粒子が形成される。感染性ウイルスを産生するRNPベクターとしては、例えば N、P、M、F、HN、およびL遺伝子をコードするウイルスゲノムRNAと、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質を含むRNPが挙げられる。このようなRNPを細胞内に導入すると、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質の働きによりウイルスゲノムが発現、複製され、感染性ウイルスベクターが増幅する。

RNPを細胞に導入するには、例えばリポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、

Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。複製型ウイルスの場合、産生されたウイルスは、培養細胞、鶏卵、個体（例えばマウスなどの哺乳動物）などに再感染させて増幅または継代することができる。

逆に、M、Fおよび/またはHN遺伝子が含まれていないパラミクソウイルスベクターも、本発明の組換えパラミクソウイルスベクターに含まれる。このようなウイルスベクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスベクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはこれらのいずれかの遺伝子を欠損しているため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスベクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子および/またはHN遺伝子が挙げられる。例えば、F遺伝子が欠損した組換えパラミクソウイルスベクターゲノムを発現するプラスミドを、F蛋白質の発現ベクターならびにNP、P/CおよびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ウイルスベクターの再構成を行うことができる（国際出願番号 PCT/JP00/03194 および PCT/JP00/03195）。また、例えば、F遺伝子が染色体に組込まれた宿主細胞を用いて製造することもできる。これらの蛋白質群を外から供給する場合、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をベクターのエンベロープに含むベクターを作製することもできる。このようなタンパク質に特に制限はない。例えば、他のウイルスのエンベロープタンパ

ク質、例えば水疱性口内炎ウイルス (VSV) のGタンパク質 (VSV-G) を挙げることができる。本発明のパラミクソウイルスベクターは、VSV-Gタンパク質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープタンパク質を含むシュードタイプウイルスベクターが含まれる。このとき、パラミクソウイルスがもともと保持しているF遺蛋白質および/またはHN蛋白質を欠損しているもよい。

また、本発明のベクターを構成する成分としては、完全なセンダイウイルスゲノムではなくても、DI粒子(J.Virol. 68,8413-8417,1994)などの不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も用いることが可能である。

また、本発明のベクターには、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体、またはそれらの断片等が含まれていても構わない。例えば、特定の細胞に接着しうるような、接着因子、リガンド、受容体等由来のポリペプチドを細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラタンパク質をエンベロープとして用いることも可能である。これにより、特定の組織を標的とするベクターを作り出すことができる。これらの蛋白質はウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構成時に、ウイルスゲノム以外の遺伝子（例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体上の遺伝子など）の発現により供給されてもよい。

また、本発明のウイルスベクターは、例えば免疫原性を低下させるために、またはRNAの転写効率や複製効率を高めるために、ベクターに含まれるウイルス遺伝子が改変されたものであってもよい。具体的には、例えば複製因子であるNP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミニダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、

例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより、膜融合リボソームの融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用して抗原提示能を弱めたウイルスベクターを作製することもできる。

本発明のウイルスベクターは、ゲノムRNA中に外来遺伝子をコードすることができる。外来遺伝子を含む組換えパラミクソウイルスベクターは、上記のパラミクソウイルスベクターゲノムに外来遺伝子を挿入することによって得られる。外来遺伝子としては、標的とする血管細胞において発現させたい蛋白質をコードする遺伝子などが挙げられ、特に制限されない。外来遺伝子は天然型蛋白質をコードする遺伝子であってもよく、また天然型蛋白質と同等の機能を有する蛋白質をコードする限り、欠失、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質コードする遺伝子であってもよい。また、外来遺伝子としては、ドミナントネガティブ変異体等の人工的な蛋白質であってもよい。また、例えば、アンチセンスまたはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。

例えば、遺伝子治療などを目的とする場合には、該ウイルスベクターのゲノムをコードするDNA（ウイルスベクターDNA）に対象となる疾患の治療用遺伝子を挿入する。ウイルスベクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例えば、センダイウイルスベクターDNAにおいては、転写終結(E)配列と転写開始(S)配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい（Journal of Virology, Vol.67, No.8, 1993, p.4822-4830）。外来遺伝子は、ウイルスの各遺伝子（NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子）の前および/または後ろに挿入することができる。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜 E-I-S配列（転写開始配列－介入配列－転写終結配列）またはその部分を挿入し、各遺伝子の間にE-I-S配列を配置する。

挿入した外来性遺伝子の発現量は、外来遺伝子の5'に付加する転写開始配列

の種類により調節することができる（国際出願番号 PCT/JP00/06051）。また、遺伝子挿入の位置、および遺伝子の前後の塩基配列により調節しうる。例えば、センドライウイルスにおいては、挿入位置がウイルスゲノムのネガティブ鎖RNAの3'端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、NP遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が高い。外来遺伝子の高い発現を得るためには、外来遺伝子をNP遺伝子上流（マイナス鎖においては3'側）またはNP遺伝子とP遺伝子の間など、ネガティブ鎖ゲノムにおいて上流領域に挿入することが好ましい。逆に、挿入位置がネガティブ鎖RNAの5'端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が低くなる。外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、例えばネガティブ鎖の最も5'側、すなわち野生型ウイルスゲノムにおいてはL遺伝子の下流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の5'隣接部位）、またはL遺伝子上流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の3'隣接部位）に外来遺伝子を挿入する（日本国出願番号 特願2000-152726 参照）。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルスタンパク質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。例えば、高力価ウイルスベクターの投与による導入遺伝子の高発現が毒性を示す場合は、投与するウイルス力価を制限することができる他、例えばベクターにおける外来遺伝子の挿入位置をネガティブ鎖のなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、個々のウイルスベクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な治療効果が得られるすることも可能である。

外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。ゲノムをコードするベクターDNA中の当該制限酵素部位に外来遺伝子断片を挿入することができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。また、

本発明のベクターは、このように外来遺伝子を挿入した以外に位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。

外来遺伝子を有する組換えセンダイウイルスベクターは、例えば、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466 の記載に基づいて、次のようにして構築することができる。

まず、所望の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/ μ l以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子を、NotI部位を利用してウイルスゲノムをコードするDNAに挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異導入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から所望の遺伝子断片をPCRにより増幅回収する。増幅された断片の両端がNotI部位とし、さらに一端にセンダイウイルスの転写終結配列 (E)、介在配列 (I) 及び転写開始配列 (S) (EIS配列) のコピーを付加するために、NotI制限酵素切断部位配列及び転写終結配列 (E)、介在配列 (I) 及び転写開始配列 (S) と目的遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側 (センス鎖) 合成DNA配列及びリバース側 (アンチセンス鎖) 合成DNA配列を作成する。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために 5' 側に任意の2以上のヌクレオチド (好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT) を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスペーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

リバーズ側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド（好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、NotI認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのEIS塩基配列の合計が6の倍数になるように塩基数を設計する（いわゆる「6のルール (rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998）。さらに挿入断片の3'側にセンダイウイルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-CTTTCACCT-3'（配列番号：1）、I配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTTCTTACTACGG-3'（配列番号：2）、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバーズ側合成オリゴDNAの3'の末端とする。

PCRは、例えば、ExTaqポリメラーゼ（宝酒造）を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ（NEB）を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミド、例えば、pSeV18'b(+)(Yu, D. et al., Genes to Cells 2: 457-466, 1997)またはpSeV(+)(Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-587, 1997)のNotI部位にクローニングし、外来cDNAが組込まれた組換えセンダイウイルスcDNAを得る。またプラスミドベクターpBluescriptを介さずにNotI部位に直接挿入し、組換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

例えば、組み換えセンダイウイルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる（Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-598, 1997, Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997）。具体的には、まずNotI制

限部位を有する18bpのスペーサー配列 (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3') (配列番号: 3) を、クローニングされたセンダイウイルスゲノムcDNA (pSeV(+)) のリーダー配列とN-タンパク質をコードする配列の5'末端との間の隣接遺伝子座に挿入し、肝炎デルタウイルスのアンチゲノム鎖 (antigenomic strand) 由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18'b(+))を得る (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)。pSeV18'b(+))のNotI部位に外来遺伝子断片を挿入し、所望の外来遺伝子が組込まれた組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることができる。

このようにして作製した組み換えパラミクソウイルスベクターDNAを試験管内または細胞内で転写させ、ウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下でRNPを再構成させると、このRNPを含むウイルスベクターを生成させることができる。本発明は、本発明のパラミクソウイルスベクターのゲノムをコードするDNAを転写させる工程を含む、該ベクターの製造方法を提供する。また本発明は、該DNAからなる、本発明のウイルスベクター製造用DNAを提供する。また本発明は、本発明のウイルスベクターを製造するための、該ベクターのゲノムをコードするDNAの使用に関する。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる(国際公開97/16539号; 国際公開97/16538号; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーベストウイルス、センダイウイルスなどを含むパラミクソウイルスベクタ

一をDNAから再構成させることができる。ウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。

例えば、ベクターDNAを細胞内に導入する方法には、次のような方法、①目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、③目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貪食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, *Virology* 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, *Cell* 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞を共沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO₂、35°C、15~24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中のDNA濃度が 20~30 µg/ml のとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W. 5 × 10⁵) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択

性がないという点で①や②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界（電極間のギャップ、電圧）の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、本発明においては、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169) が用いられる。

cDNAからの再構成は具体的には次のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質（100 units/ml ペニシリンGおよび100 μ g/ml ストレプトマイシン）を含む最少必須培地（MEM）を用いてサル腎臓由来細胞株LLCMK2を70～80%コンフルエントになるまで培養し、例えば 1 μ g/ml psoralen（ソラレン）存在下 UV照射処理を20分処理で不活化した、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3（Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986; Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996）を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間が適宜調整することができる。感染1時間後、2～60 μ g、より好ましくは3～5 μ gの上記の組換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必須なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド（24-0.5 μ gのpGEM-N、12-0.25 μ gのpGEM-P、および24-0.5 μ gのpGEM-L、より好ましくは例えば1 μ gのpGEM-N、0.5 μ gのpGEM-P、および1 μ gのpGEM-L）（Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996）と共にSuperfect（QIAGEN社）を用いたリポフェクション法等によりトランスフェクションする。トランスフェクションを行った細胞は、所望により100 μ g/mlのリファンピシン（Sigma）及びシトシンアラビノシド（AraC）、より好ましくは40 μ g/mlのシトシンアラビノシド（AraC）（Sigma）のみを含む血清不含のMEM

で培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する (Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、LLC-MK2細胞にトランスフェクションして培養する。培養3~7日後に培養液を回収する。エンベロープ蛋白質をコードする遺伝子を欠損した複製能を持たないウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞に重層して培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる (国際出願番号 PCT/JP00/03194 および PCT/JP00/03195参照)。あるいは、上記の凍結融解による細胞破碎物を10日齢の発育鶏卵の漿尿膜内へ接種し、約3日後、漿尿液を回収してもよい。培養上清または漿尿液に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endo-point 希釈法」(Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., *Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells*. Ed. by Baker AH. *Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press*: pp. 295-306, 1999) により決定することができる。混入し得るワクシニアウイルスvTF7-3を除去するために、得られた漿尿液試料を適宜希釈 (例えば 10^6 倍) して、鶏卵で再増幅させることができる。再増幅は、例えば3回またはそれ以上繰り返すことができる。得られたウイルスストックは -80°C で保存することができる。回収されるセンダイウイルスの力価は、通常 $10^8 \sim 10^9$ PFU/mlであり、共に含まれるワクシニアウイルスvTF7-3は通常 $10^3 \sim 10^4$ PFU/ml以下である。

ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、LLCMK2細胞、サル腎由来のCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞

などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている（中西ら編,(1993),「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp.153-172)。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9~12日間 37~38°Cで培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを漿尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組み換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ漿尿液を回収する。漿尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代真人,「ウイルス実験プロトコール」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp. 68-73 (1995))。

例えば、F蛋白質を欠失したパラミクソウイルスベクターの構築と調製は、以下のように行うことができる（国際出願番号 PCT/JP00/03194 および PCT/JP00/03195参照）。

<1> F欠失型センダイウイルスゲノムcDNAおよびF発現プラスミドの構築

センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNA、pSeV18⁺ b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) (「pSeV18⁺ b(+)」は「pSeV18⁺」ともいう) のcDNAをSphI/KpnIで消化してフラグメント(14673bp)を回収し、pUC18にクローニングしてプラスミドpUC18/KSとする。F欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行う。F遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてF遺伝子のORF(ATG-TGA=1698bp)を除いてatgcatgccggcagatga(配列番号: 4)で連結し、F欠失型SeVゲノムcDNA (pSeV18⁺/ΔF)を構築する。PCRは、Fの上流には (forward: 5'-gttgagtactgcaagagc / 配列番号: 5, reverse: 5'-tttgccggcatgcatgtttcccaaggggagagttttgcaacc / 配列番号: 6)、F遺伝子の下流には (forward: 5'-atgcatgccggcagatga / 配列番号: 7, reverse: 5'-

tgggtgaatgagagaatcagc/配列番号：8)のPCR産物をEcoT22Iで連結する。このように得られたプラスミドをSacIとSalIで消化して、F欠損部位を含む領域の断片(4931bp)を回収してpUC18にクローニングし、pUC18/dFSSとする。このpUC18/dFSSをDraIIIで消化して、断片を回収してpSeV18'のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18'/ΔFを得る。

外来遺伝子は、pUC18/dFSSのF欠失部位にある制限酵素 NsiI および NgoMIV 部位に挿入する。このためには、例えば外来遺伝子断片を、NsiI-tailedプライマーおよびNgoMIV-tailedプライマーで増幅すればよい。

<2> SeV-F蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

センダイウイルスのF遺伝子(SeV-F)を発現するCre/loxP誘導型発現プラスミドの構築はSeV-F遺伝子をPCRで増幅し、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミド pCALNdlw (Araiら J. Virology 72, 1998, 1115-1121)のユニークサイト SwaI部位に挿入し、プラスミド pCALNdLw/Fを構築する。

F欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立する。細胞は、例えばSeVの増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞を用いることができる。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不活化ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/ml、およびストレプトマイシン 50μg/mlを添加したMEMで37°C、5% CO₂で培養する。SeV-F遺伝子産物は細胞傷害性を有するため、Cre DNAリコンビナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドpCALNdLw/Fを、リン酸カルシウム法(mammalian transfection kit (Stratagene))により、周知のプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に遺伝子導入を行う。

10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10μgのプラスミドpCALNdLw/Fを導入後、10mlの10% FBSを含むMEM培地にて、37°Cの5% CO₂ インキュベーター中で24時間培養する。24時間後に細胞をはがし、10ml培地

に懸濁後、10cmシャーレ 5 枚を用い、5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418 (GIBCO-BRL)を1200 μ g/mlを含む10mlの10%FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2 日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。該 培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて回収する。回収した各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続ける。

F蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、アデノウイルスAxCANCreを斉藤らの方法 (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998))により moi=3 で感染させて行う。

<3> F 欠失SeVウイルスの再構築及び増幅

上記 pSeV18'/ Δ F の外来遺伝子が挿入されたプラスミドを以下のようにして LLC-MK2細胞にトランスフェクションする。LLC-MK2 細胞を 5×10^6 cells/dish で 100mm ペトリ皿に蒔き、24時間培養後、ソラレンと長波長紫外線 (365nm) で 20 分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) に室温で1時間感染させる (moi=2~3、好適にはmoi=2が用いられる)。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、例えば15ワットバルブを5本が装備された UV Stratakinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V), ストラタジーン社, La Jolla, CA, USA) を用いる。細胞を3回洗浄してからプラスミド pSeV18'/ Δ F-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, 及びpGEM/L(Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579 (1996)) をそれぞれ12 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 及び4 μ g /dish の量比でOptiMEM(GIBCO)に懸濁し、SuperFect transfection reagent(1 μ g DNA/5 μ l の SuperFect, QIAGEN)を入れて混合し、室温で10分間放置後、最終的に3%FBSを含むOptiMEM 3mlに入れ、細胞に添加して培養する。3時間培養後、細胞を、血清を含まないMEM で2回洗浄し、シトシン β -D-アラビノフラノシド40 μ g/ml (AraC, Sigma), トリアシン7.5

$\mu\text{g/ml}$ (GIBCO) を含むMEMで70時間培養する。これらの細胞を回収し、ペレットをOptiMEM に懸濁する (10^7 cells/ ml)。凍結融解を3回繰り返してlipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim)と混合し (10^6 cells/ $25\mu\text{l}$ DOSPER) 室温で15分放置した後、上記でクローニングしたF発現ヘルパー細胞の一つLLC-MK2/F7細胞にトランスフェクション (10^6 cells /well 12-well-plate) し、血清を含まないMEM ($40\mu\text{g/ml}$ AraC, $7.5\mu\text{g/ml}$ トリプシンを含む)で培養し、上清を回収する。

欠損型ウイルスベクターを調製する場合、例えば、ゲノム上で欠損しているエンベロープ遺伝子が異なる2種のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するエンベロープタンパク質が、もう一方の複合体からの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、エンベロープタンパク質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのエンベロープ遺伝子欠損型ウイルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウイルスは、エンベロープ遺伝子が欠損しているため、エンベロープ遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなり長い外来遺伝子を保持することができる。また、元々感染性のないこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

外来遺伝子として疾患の治療用遺伝子を用いてウイルスベクターを調製すれば、このベクターを投与して遺伝子治療を行うことが可能となる。本発明のウイルスベクターの投与により、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子等を発現させることが可能である。

本発明のウイルスベクターは、薬学的に許容される所望の媒体と共に組成物とすることができる。「薬学的に許容される担体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を阻害しない材料である。例えば本

発明のウイルスベクターを生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) などで適宜希釈して組成物とすることができる。本発明のウイルスベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては漿尿液を含んでよい。漿尿液は、生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) などで適宜希釈することができる。また本発明のウイルスベクターを含む組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の媒体を含んでいてもよい。さらに、その他にも、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。本発明の組成物は医薬組成物を含む。また本発明は、本発明のウイルスベクターまたは上記組成物の医薬としての使用にも関する。

上記のようにして得られた組換えパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む組成物を血管に接触させることで、組換えパラミクソウイルスベクターが持つ外来遺伝子を血管細胞へ導入することができる。感染力を持つパラミクソウイルスベクターは、血管に短時間暴露するだけで細胞に核酸を導入することが可能である。パラミクソウイルスベクターを利用した遺伝子導入の標的となる血管細胞としては、特に制限はないが、例えば、血管細胞が血管内腔の内皮細胞、血管の脈管（血管壁栄養血管）の内皮細胞、血管中膜の血管平滑筋細胞、および/または外膜の細胞などが好適である。

本発明のベクターによる血管細胞を標的とした治療の対象となりうる疾患、傷害の具体例としては、以下のようなものが挙げられる。

- 1) 経皮的冠動脈形成術 (PTCA) 後再狭窄
- 2) 自家静脈グラフトによるバイパス手術後のグラフト晚期閉塞
- 3) 血管攣縮 (スパズム)
- 4) 血栓形成に対する血栓融解蛋白や抗凝固蛋白（例えば組織プラスミノゲン・アクチベーター、組織因子反応経路阻害因子 (TFPI) など）遺伝子導入
- 5) 虚血性疾患（例えば閉塞性動脈硬化症、狭心症など）に対する血管新生因子遺伝子導入

また、血管細胞を標的とした遺伝子導入（例えば、遺伝子治療）において特に

有用な外来遺伝子としては、以下のようなものが挙げられる。

- 1) 細胞周期抑制遺伝子 (例えばp53、p21、p16、p27など)
- 2) 細胞内増殖シグナル抑制因子遺伝子 (例えば、変異型H-Rasなど)
- 3) 分泌型細胞増殖抑制因子遺伝子 (例えば、eNOS、CNP:C型ナトリウム利尿ペプチドなど)
- 4) 血管平滑筋細胞弛緩因子遺伝子 (例えば、eNOS、CNPなど)
- 5) 血管平滑筋細胞弛緩イオンチャンネル遺伝子 (例えば、C末欠損型Kir 6.2カリウムイオンチャンネルなど)
- 6) 血栓溶解蛋白遺伝子 (例えば組織プラスミノゲン・アクチベーター、ウロキナーゼなど)
- 7) 組織因子反応経路阻害因子遺伝子 (例えば、TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitorなど)
- 8) 血管新生因子遺伝子 (例えば VEGF、FGF、HGFなど)

遺伝子治療は、患部の血管の管腔内または外から、パラミクソウイルスベクター含有組成物を *in vivo* で投与し、外来遺伝子を血管細胞内で発現させることにより、実施することができる。また、*ex vivo*による投与を行ってもよい。*in vivo*による遺伝子導入は例えば、血管内腔への単純フロー法、陽圧をかけた管腔隙注入、血管等への滴下等の局所投与により行うことができる。その他に、例えば、ダブルバルーンカテーテルを用いた血流遮断による内腔への遺伝子導入、インフュージョンバルーンカテーテルによる血管平滑筋層への強制的注入、またはハイドロゲルバルーンカテーテルによる血管内腔へのベクターの圧着などによる投与を行うことも可能である。

本発明のベクターは、プロテアーゼと併用することにより、血管の中膜層等へ効率的に遺伝子を導入することができる。用いられるプロテアーゼは、血管中 (例えば内膜および中膜) の細胞外マトリクスを分解するものが好ましい。このようなプロテアーゼとしては、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) [ヒトでは約

20種類 (Seiki, M., 1999, APMIS 107: 137-43) が知られている。その他、両生類コラゲナーゼ4種類 (Stolow, M. A., 1996, Mol. Biol. Cell. 7: 1471-83)、ウニ孵化酵素 (Nomural, K. et al., 1997, Biochemistry 36(23):7225-38)、*Clostridium histolyticum* 由来コラゲナーゼ (Yoshida, E. and H. Noda, 1965, Biochim. Biophys. Acta 105(3):562-74) などが含まれる]、エラスターゼ、プラスミン、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA)、ウロキナーゼ、カテプシン (B, L, D, G)、トリプシン、トロンビンなどが挙げられるが、これらに制限されない。特に、本発明のベクターの投与において好ましいプロテアーゼとしては、コラゲナーゼ、ウロキナーゼ、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA)、エラスターゼ、プラスミン、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などが挙げられ、中でもより好ましくはコラゲナーゼ、プラスミン、およびMMPが挙げられる。コラゲナーゼとしては、例えばコラゲナーゼ type 4 (例えば*Clostridium histolyticum* 由来など) が挙げられる。また、MMPとしては、MMP2およびMMP9が挙げられる。MMPは、aminophenylmercuric acetate (APMA) 等で活性化することができる。また、基底膜下の層が厚く肥厚したフィブリンを含む内膜を持つ血管内腔からベクターを導入するには、MMP2またはプラスミン等が好適である。プロテアーゼは単独で、あるいは複数を組み合わせて用いることができる。

プロテアーゼおよび本発明のベクターを用いた血管細胞への核酸の導入は、(a) 血管細胞を含む組織をプロテアーゼで処理する工程、および (b) 組換えパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を血管細胞へ接触させる工程を、(a) (b) の順または同時に行うことを含む方法により行うことができる。

高い遺伝子効率を得るには、血管細胞へのベクターの投与に先だってプロテアーゼ処理することが好ましいが、臨床適用において、血流を遮断できる時間が限られる場合は、プロテアーゼとベクターを混合して投与することができる。本発明において、同時投与により血管中膜層へのベクター感染効率の有意な上昇が明

らかにされた。同時投与より投与手順も簡略化される。プロテアーゼの処理はベクターの感染効率を上昇させるのに必要な時間処理すればよく、時間は特に制限されない。例えば実施例に記載したようなプロテアーゼ濃度において、約5～20分程度の所望の時間処理することができる。高濃度のコラゲナーゼ処理は生理的に血栓を生じ得る。好ましくはコラゲナーゼの濃度は 5000 unit/ml以下、例えば約500 unit/ml程度で用いられる。但しプロテアーゼの濃度や処理時間は適宜調節することができる。処理温度は例えば約37℃で行えばよい。プロテアーゼ処理後にベクターを感染させる場合は、感染時間はベクターが標的血管細胞に導入されるのに必要な時間行えばよく、制限はない。臨床適用に際しては、血流を遮断する時間を短くするため、最小限の時間に留めることが望ましい。感染時間は、例えば数分間、具体的には約1～約10分間程度の所望の時間とすることができる。本発明のベクターは、1分間以上の暴露時間において有意な感染を示しうる。例えば、冠動脈導入においては、血流遮断の時間は5分間以内とすることが望ましく、例えば約1～5分間以内の短時間の処理が有効である。インビボでの血管内腔のプロテアーゼ処理およびベクター投与は、例えば上記のようにダブルバルーンカテーテルを用いた血流遮断による内腔への遺伝子導入、インフュージョンバルーンカテーテルによる血管平滑筋層への強制的注入、またはハイドロゲルバルーンカテーテルによる血管内腔へのベクターの圧着などにより行うことが可能である。投与の際に血管内皮を剥離して感染率を高めることもできる。

さらに、ウイルスベクターに生体適合性のポリオール（例えば poloxamer 407など）を組み合わせることで、ウイルスベクターの形質導入率を上昇させ得る(March et al., Human Gene Therapy 6: 41-53, 1995)。これによりウイルスベクターの投与量を低く抑えたり、または感染時間を短縮することができる。本発明においては、生体適合性のポリオールを、本発明のパラミクソウイルスベクターと組み合わせる組成物とすることができる。また、別の生体適合性ポリオールを組み合わせる用いてもよい。これらの薬剤は、ベクターと一緒に投与することもできれば、別々

に投与することもできる。

本発明のベクターをマトリックスの形で投与することも有用である。知られている方法としては、アテロコラーゲンマトリックスにウイルスベクターを分散させて、凍結乾燥により固形化しマトリックスが徐々に崩壊することを応用するもので、一時的遺伝子発現で知られているアデノウイルスベクターや裸のDNAの効果持続化に関する報告がある (Ochida, T. et al., Nature Medicine 5, 707-710, 1999)。本発明のウイルスベクターは、このような助剤と共存させることが可能であり、凍結乾燥可能である。また発現効果を増強するためにカチオン脂質を共存させることもできる。

投与可能な小さなマトリックスであっても、18G程度の注射針により長期間に亘り成長因子等を徐放できることは知られている。例えば、蛋白質の製剤において、成長ホルモン等の持続時間は、成長ホルモン等を単独で投与した場合に比べて、血液中の持続時間が長く、例えば、7日以上である。通常、10日以上に亘る持続も達成できると報告されている (特開平 10-001440)。そのため、製剤の投与回数、患者に与える苦痛を著しく低減できる。前記製剤は、例えば、皮下や筋肉内に投与される固形注射剤 (植込み剤など) や、座剤などの粘膜吸収剤として利用できる。剤形は、注射剤として用いる場合には、注射針で投与可能な柱状又は粒状である場合が多い。好ましい製剤の形状には、角柱状、円柱状などの柱状および球状などの粒状が含まれる。

本発明の非経口製剤の大きさも、投与形態に応じて選択でき、患者に過度の苦痛を与えることのない大きさであればよい。注射剤としては、柱状マトリックスで構成されている場合、例えば、直径3mm以下 (例えば、0.1~3mm)、長さ30mm以下 (例えば、0.5~30mm)、好ましくは14G以下の注射針で投与可能な直径1.3mm以下 (例えば、0.1~1.2mm)、長さが20mm以下 (例えば、0.5~20mm)、さらに好ましくは直径0.1~1mm、長さ1~20mm程度であり、円柱が好ましい。また、粒状マトリックスで構成された注射剤の粒径は、最大直径1mm以下 (例えば、0.1 μ m~1mm程

度)、好ましくは $150\mu\text{m}$ 以下(例えば、 $0.5\sim 100\mu\text{m}$ 程度)、さらに好ましくは $1\sim 100\mu\text{m}$ 程度である。また、マトリックスの重量は、製剤の形態に応じて選択でき、注射剤においては、例えば、 40mg 以下、好ましくは $1\sim 25\text{mg}$ 程度である場合が多い。

本発明のウイルスベクターは、有効量のベクターが血管細胞に導入されるのに十分な量を投与される。「有効量」とは、本発明に方法において、所望の治療または予防効果を少なくとも部分的にもたらすように対象組織の細胞に遺伝子が導入される量を言う。所望の遺伝子を含む本発明のウイルスベクターの有効量が投与されることにより、ベクターが導入された細胞から導入遺伝子産物が産生される。ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。好ましくは、投与するベクター量は約 10^5 pfu/mlから約 10^{11} pfu/mlの範囲内であるとよい。より好ましくは、投与するベクターの量は約 10^7 pfu/mlから約 10^9 pfu/mlの範囲内であるとよい。最も好ましくは、約 1×10^8 pfu/mlから約 5×10^8 pfu/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。

本発明のウイルス含有組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

図面の簡単な説明

図1は、BSMCへのSeV-ルシフェラーゼの用量依存的な遺伝子導入効率を示す棒グラフである。6ウェルプレートにおいて、 10^5 細胞を各ウェルに播種し、SeV-ルシフェラーゼをMOI=0.1、1、10、100、およびMOI=100の野生型 SeVをそれぞれ添加した(各n=6)。48時間後、細胞をルシフェラーゼアッセイに供した。データは平均 \pm S.D.として表し、各ドットは、蛋白質濃度によって標準化した各ウェルの値を示す。

図2は、野生型SeV(MOI=100)または種々の量のSeV-NLS-lacZ(MOI=1、10および100)に暴露したBSMCの位相差光学顕微鏡写真である。用量依存的な遺伝子の導

入効率を示す（各n=6）。遺伝子導入の48時間後に、細胞を2%パラホルムアルデヒド+0.25%グルタルアルデヒドで10分間固定し、室温において1時間X-Gal溶液中で反応させた。はっきりとした核の局在化を示す青いシグナルの数は、用量依存的に増加している。初期倍率：100倍。

図3は、ヒト伏在静脈のSeV-ルシフェラーゼの用量依存的な遺伝子導入効率を示す棒グラフである。長さ5～10mmの静脈を十分に洗浄し、 10^7 、 10^8 または 10^9 プラーク形成単位/mlのSeV-ルシフェラーゼを含有するベクター溶液またはウイルスを含有しないベクター溶液に入れた。48時間後、静脈についてルシフェラーゼアッセイを実施した。データは平均±S.D.として表し、各ドットは蛋白質濃度によって標準化した各ウェルの値を示す。

図4は、MOI=10のSeV-ルシフェラーゼまたは野生型SeVによるトランスフェクション後のBSMCのレポーター遺伝子の発現の時間依存的な増加を示す棒グラフである（各n=6）。遺伝子導入後の各経過時点において細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイを実施した。遺伝子発現レベルは遺伝子導入の2日後またはそれ以降にほぼプラトーに達した。データは平均±S.D.として表し、各ドットは蛋白質濃度によって標準化した各ウェルの値を示す。対数目盛で表した。

図5は、BSMCの増殖活性に対するSeV感染の影響を示す図である。細胞の播種後、様々な量の組換え野生型SeVを感染させ、各時間において細胞数を計数した。MOI=1,000において、有意な細胞増殖の低下が見られた。

図6は、外来遺伝子発現の時間経過を示す図である。

a, BSMCの対数増殖期におけるゲノム安定性を示唆している。細胞を種々の濃度のSeV-ルシフェラーゼ（MOI=0.1、1、10）に暴露し、コンフルエントになる直前に細胞の3/4についてルシフェラーゼアッセイを実施し、細胞の残りの1/4は繰り返し継代培養した。各ドットは各経過時点での蛋白質濃度で標準化した値を示す。これらの実験はトリPLICATEで実施し、結果は代表的なものを示している。対数目盛で示した。

b, 静止期のBSMCにおけるゲノムの安定性を示唆している。BSMCの増殖をコンフルエントにして静止させ、その後2日間放置した。細胞をMOI=10のSeV-ルシフェラーゼに1時間暴露し、各経過時点においてルシフェラーゼアッセイを実施した（それぞれ、n=6）。データは平均±S.D.として表した。各ドットは蛋白質濃度で標準化した各ウェルの値を示す。対数目盛で表した。

図7は、SeVを介した遺伝子導入に対するベクター暴露時間の影響を示す図である。

a. BSMCのSeVを介した遺伝子導入に対するベクター暴露時間の影響を示すグラフである。BSMCを1、2、5、10、30、60、180分または24時間および48時間などの各時間の間、MOI=10のSeV-ルシフェラーゼに暴露し、新鮮な培地に浸して2回追加洗浄した（各n=6）。48時間後、細胞をルシフェラーゼアッセイに供した。データは平均±S.D.として表した。各ドットは蛋白質濃度で標準化した各ウェルの値を示す。対数目盛で表した。

b. ヒト伏在静脈へのSeVを介した遺伝子導入に対するベクター暴露時間の影響を示すグラフである。5～10mmのヒト大伏在静脈を1、2、5、10、30、60分または3および6時間などの各時間の間、MOI=10のSeV-ルシフェラーゼに暴露し、新鮮な培地に浸して4回洗浄し、培養プレートに播いた（各n=6）。48時間後、静脈をルシフェラーゼアッセイに供した。データは平均±S.D.として表した。各ドットは蛋白質濃度で標準化した各ウェルの値を示す。対数目盛で表した。

図8は、組換えアデノウイルスを介したBSMCへの遺伝子導入に対するベクター暴露時間の影響を示すグラフである。BSMCを1、2、5、10、30、60、180分または24時間および48時間などの各時間の間、MOI=10のAdexCA-lacZ (Ueno, H. et al., Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. 15: 2246-2253 (1995)) に暴露し、新鮮な培地に浸して2回洗浄した（各n=6）。48時間後、細胞を蛍光βガラクトシダーゼアッセイに供した。ベクターの暴露時間の依存して、導入遺伝子の発現が増加していることが明らかである。データは平均±S.D.として表した。各ドットは蛋白質

濃度で標準化した各ウェルの値を示す。対数目盛で表した。

図9は、150mmHgの注入圧で10分間の管腔内へのSeV-NLS-lacZを介した遺伝子導入 (5×10^8 pfu) による核局在シグナルを持つ β -ガラクトシダーゼを発現するヒト伏在静脈の実体顕微鏡像または光学顕微鏡写真である (それぞれ、 $n=6$)。遺伝子導入の2日後、静脈を2%パラホルムアルデヒド+0.25%グルタルアルデヒド中で10分間固定し、室温で3時間X-Gal中で反応させた。

a-c. 注入圧150mmHgでSeV-NLS-lacZに暴露した静脈の典型的な実体顕微鏡所見である。強く、拡散した、青いスポットが高頻度に管腔面 (a) および外膜 (b) に見られた。線路のように見える白色領域は、手術中の剥離損傷による内皮の剥落域へは遺伝子が導入されていないことを示唆する (a: 矢尻)。帯のような青い線が外膜に高頻度に見られた。これは、血管の脈管への遺伝子導入を示唆する (b: 矢印)。野生型SeVで処理した静脈では、はっきりした青いスポットは見られなかった (c)。初期倍率: a; 12倍、b; 36倍、およびc; 8倍。

dおよびe. a-cに示した同じ静脈の組織学的所見を示す図である。ほとんど全ての管腔内皮細胞 (d) およびいくつかの外膜の血管の脈管と血管周囲細胞 (e) は青色で強く染色された。核ファストレッドでカウンター染色を行った。初期倍率: dおよびe; 200倍。

図10は、150mmHgの注入圧で10分間、バルーンで損傷させた静脈の管腔内へSeV-NLS-lacZ (5×10^8 pfu) を介した遺伝子導入を行い、 β -ガラクトシダーゼの発現を観察した実体顕微鏡所見または光学顕微鏡所見を示す写真である (それぞれ、 $n=6$)。遺伝子導入の2日後、静脈を2%パラホルムアルデヒド+0.25%グルタルアルデヒド中で10分間固定し、室温で3時間X-Gal中で反応させた。

aおよびb. 注入圧150mmHgでSeV-NLS-lacZに暴露したバルーン損傷静脈の典型的な実体顕微鏡所見である。管腔面の青いスポットは顕著に喪失し、散在的になっていた (a、図9aと比較のこと)。引き続き、線状の青い線が外膜に見られたことから、血管の脈管への遺伝子導入が示唆された (b: 矢尻)。初期倍率: a; 8倍、

およびb; 12倍。

c-e. aおよびbに示したものと同一静脈の組織学的所見である。ほとんど全ての管腔内皮細胞は剥落し、X-Galは陰性であったが、薄い新生内膜では青い細胞が散在していた (c:矢尻)。

d: 厚い新生内膜を有する別の静脈の組織学的所見; 四角で示した中のいくつかの青い細胞を除いて、管腔面および新生内膜上には青い細胞はないことに注意。

e: dの高倍率像。いくつかの新生内膜毛細管はX-Galが陽性である。核ファーストレッドでカウンター染色した。初期倍率: c; 200倍、d; 60倍およびe; 200倍。

図11は、150mmHgの注入圧で10分間、バルーンで損傷させた静脈の管腔内へSeV-NLS-lacZ (5×10^8 pfu) を介した遺伝子導入を行い、 β -ガラクトシダーゼの発現を観察した実体顕微鏡所見または光学顕微鏡所見を示す写真である (それぞれ、n=6)。遺伝子導入の2日後、静脈を2%パラホルムアルデヒド+0.25%グルタルアルデヒド中で10分間固定し、室温で3時間X-Gal中で反応させた。

fおよびg. 新生内膜が引き裂かれた別の静脈の組織学的所見。f: 図10のc-eと同様、ほとんど全ての管腔内皮細胞および新生内膜細胞はX-Gal陰性であったが、中膜および外膜では青い細胞が散在していた。g: fの四角の部分の高倍率像。いくつかの紡錘形の血管平滑筋細胞は明らかにX-Gal陽性であった (矢印)。核ファーストレッドでカウンター染色した。初期倍率: f; 60倍およびg; 200倍。

図12は、ウサギ頸動脈に対する *in vivo* 遺伝子導入を示す写真である。 5×10^7 pfu のSeV-NLS-lacZをトランスフェクトし、遺伝子導入の2日後の頸動脈を取り出してX-Gal染色後、切片を作成した。

図13は、ラット胸部動脈への*ex vivo* センダイウイルスベクターの遺伝子導入を示す図である。

a) ラット胸部動脈への濃度依存的なGFP/SeVの導入効率を示す。ラット胸部動脈を切りだし、示されている濃度のGFP/SeVを含む、100 μ l Hanks 液に10分間つけた後、2回洗浄した。24wellで10% FBS添加DMEM培地CO₂インキュベーターで48時間

培養したのち、蛍光顕微鏡で観察し、 1 mm^2 あたりの細胞数をカウントした。(n=6 each)。データは濃度依存的にGFP/SeVが導入されていることを示している。

b) ラット胸部動脈への時間依存的なGFP/SeVの導入効率を示す。ラット胸部動脈を切りだし、 1×10^8 pfu/mlのGFP/SeVに示された時間侵漬させた後、2回洗浄した。24wellで10% FBS添加DMEM培地でCO₂インキュベーターで48時間培養したのち、蛍光顕微鏡で観察し、 1 mm^2 あたりの細胞数をカウントした。(n=6 each)

c) ラット胸部動脈へのアデノウイルスベクターとの導入効率の比較を示す。ラット胸部動脈を切りだし、示された濃度のLacZ/SeVおよびLacZ/Adenovirusを2分間つけた後、2回洗浄した。24wellで10% FBS添加DMEM培地でCO₂インキュベーターで48時間培養したのち、 β -galactosidase 染色キットを用いて、10分間固定、3時間染色し、 1 mm^2 あたりの細胞数をカウントした。(n=6 each)

図14は、プロテアーゼ前処理による血管へのセンダイウイルスベクター導入効率の上昇を示す図である。ラット胸部動脈を切りだし、いろいろの種類のプロテアーゼを導入前に5分間前処理した。プロテアーゼ添加 Hanks solution は予め10分間暖めておき、 1×10^8 pfu/ml LacZ/SeV のはいったHanks solution に2分間導入した後、洗浄、48時間培養した。 β -galactosidase の染色時間は3時間とした。COLはコラゲナーゼタイプ4、uPAはウロキナーゼ、tPAは組織型プラスミノゲンアクチベーター、ELはエラスターゼ、MMP9、MMP2は、マトリックスメタロプロテアーゼをあらわし、APMAで予め活性化型となっているものを使用した。(n=5 each)

図15は、プロテアーゼ前処理によるex vivoラット血管中膜へのセンダイウイルスベクター導入を示す写真である。図14でおこなった、ラット胸部動脈への導入の切片像を示した。後染色として、ヌクレオファーストレッドを用いた。未処理、エラスターゼ、ウロキナーゼ、tPAは血管内皮細胞に導入が限局されているのに対して、コラゲナーゼタイプ4、MMP9、MMP2が基底膜を越えて、中膜の平滑筋細胞まで導入ができている。中膜への導入が可能になったの酵素は、基底膜を

分解できる酵素であり、基底膜の分解が必須であることを示している。また、tPA 単独では中膜への導入が不可能であったが、10% FBSを添加した培地の場合、中膜への導入が可能になった。これは血清中のプラスミノゲンをtPAが分解し、プラスミンが働いたためと考えられる。

”untreated”：プロテアーゼ未処理、”elastase”：エラスターゼ処理、”collagenase”：コラゲナーゼ type 4 処理、”MMP9”：active-MMP9処理、”uPA”：ウロキナーゼ処理、”MMP2”：active-MMP2処理、”tPA”：組織型プラスミノゲンアクチベーター処理、”tPA+10%FBS”：tPA + 10%FBS処理。

図16は、プロテアーゼ処理によるラット血管中膜へのin vivoセンダイウイルス導入を示す写真である。in vivoでのプロテアーゼ処理の効果を確かめるために、ラット腹部大動脈とラット頸動脈に対するセンダイウイルスベクターの導入を試みた。A, B, C, Dがラット腹部大動脈へのNLS-LacZ/SeV導入後の切片、E, Fがラット頸動脈へのNLS-LacZ/SeV導入後の切片をあらわしている。腹部大動脈の場合、開腹し、動脈、静脈を剥離し、支流をクリップで血流を遮断した後、インシュリン針でプロテアーゼを注入した。5分後、生理食塩水で血液をよく洗浄した後、NLS-LacZ/SeV (1×10^9 pfu/ml) 25 μ lを注入し、2分間後血流を再開した。3日後、導入した血管を切除し、 β -galactosidase 染色キットで固定、染色した。ラット頸動脈の場合、同様に総頸動脈へ導入するが、Fでは生理食塩水で洗浄後、コラゲナーゼタイプ4 (final 500unit/ml)とNLS-LacZ/SeV (final 1×10^9 pfu/ml)を等量混合した溶液 10 μ lの同時投与を行った。5分後、血流を再開した。3日後、導入した血管を切除し、 β -galactosidase 染色キットで固定、染色した。未処理のものでは、血管内皮細胞のみにセンダイウイルスベクターは遺伝子導入されるが、これらの酵素を前処理することによって、中膜への感染が可能になった。また、同時投与の実験でも中膜への遺伝子導入がみられた。

”Untreat”：プロテアーゼ未処理、”MMP9”：active-MMP9処理、”Plasmin”：プラスミン処理、”MMP2”：active-MMP2処理、”collagenase”：コラゲナーゼ type 4 処

理。

図17は、プロテアーゼ処理によるヒト大伏在静脈へのex vivo センダイウイルスベクター遺伝子導入を示す写真である。下肢静脈瘤患者より手術時に献体を受けたヒト大伏在静脈を用いて、プロテアーゼ処理による新生内膜へのex vivo センダイウイルスベクター遺伝子導入を試みた。Aが未処理、BがMMP2とNLS-LacZ/SeV(1×10^9 pfu/ml)の同時投与、CがプラスミンとNLS-LacZ/SeV(1×10^9 pfu/ml)の同時投与の切片像を示している。MMP2, プラスミンで処理したもので、基底膜下の新生内膜への導入が可能になった。

”Untreat”：プロテアーゼ未処理、”MMP2”：active-MMP2処理、”Plasmin”：プラスミン処理。

発明を実施するための最良の形態

実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、本明細書全体を通じて引用された文献（学術文献、特許、公開特許出願を含めて）の内容はすべて、本明細書に組み込まれる。以下に本実施例における実験方法を示す。

i) 細胞とインビトロにおける遺伝子導入

ウシ大動脈平滑筋細胞（BSMC）は記載されたようにウシ大動脈組織から採取した（Yonemitsu, Y. et al., Lab. Invest. 75: 313-323, 1996; Yonemitsu, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 231: 447-451, 1997; Yonemitsu, Y. et al., Circ. Res. 82: 147-156, 1998）。シミアンウイルス40ラージT抗原でトランスフォームさせたアフリカミドリサル腎細胞であるCOS7細胞、およびヒト胎児腎細胞（HEK293）はATCC（American Type Culture Center）から入手した。これらの細胞はプラスチック製の培養ディッシュで10%ウシ胎仔血清（FBS）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）で培養した。6~8回継代したBSMCを実験に用いた。全ての実験において、種々の濃度のベクター溶液を培養培地に添加すること

によって遺伝子導入を行い、図4以外は特に記載しない限り遺伝子のトランスフェクションから48時間後に各レポーター遺伝子のアッセイを行った。各実験の詳細は文中と図の説明中に記載した。

ii) 培養細胞のルシフェラーゼアッセイおよび蛍光 β -ガラクトシダーゼアッセイ

トランスフェクションから48時間後に、細胞をリン酸緩衝生理食塩液 (PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 および 1 mM KH_2PO_4 , pH 7.2) で2回洗浄し、1× Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Madison, MA) 200 μ l で処理した。細胞溶解液を1.5 mlのエッペンドルフチューブに移し、15,000 rpmで遠心分離して残渣を除去した。ルシフェラーゼアッセイにおいては、上清 20 μ l をルシフェラーゼアッセイ緩衝液 (Promega) 100 μ l に添加し、次いでルミノメーター (Model LB9507, EG&G Berthold) で相対ルシフェラーゼ活性を測定した。蛍光 β -ガラクトシダーゼアッセイにおいては、上清 20 μ l を β -ガラクトシダーゼ反応緩衝液 (Clontech Inc., Palo Alto, CA) 200 μ l に添加し、次いでルミノメーターで相対ルシフェラーゼ活性を測定した。市販の蛋白質アッセイシステム (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hertfordshire, UK) を使用したBradford法によって蛋白濃度を測定し、データをRLU (relative light unit) /mg蛋白質として表した (RLU; relative light unit, 相対光線単位)。各実験は3回以上繰り返し実施し、代表的な結果を得た。

iii) 培養細胞のX-Gal組織化学

トランスフェクションから48時間後、細胞をPBSで2回洗浄し、2%ホルムアルデヒドで10分間固定した。0.1%Triton-Xを含有するPBSに浸して細胞を2回洗浄し、X-Gal (0.2% 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド、1 mmol/l $\text{K}_4(\text{CN})_6$ 、3.3 mmol $\text{K}_3(\text{CN})_6$ 、60 mmol/l Na_2HPO_4 、および40 mmol/l NaH_2PO_4) を各ウェルに添加し、室温で1時間放置した。PBSに浸して反応を停止し、位相差顕微鏡下で観察した。

iv) ヒト伏在静脈および器官培養への遺伝子導入

下肢の静脈瘤の切除術中に新鮮なヒト大伏在静脈を採取し、以下の2種の異なる遺伝子導入手法をランダムに実施した。20の静脈（男性：6、女性：14、年齢：22-82、平均 57.4）を集めた。そのうち2つは明らかな静脈炎が見られたため除外した。得られた静脈は幾つかの切片に切り分けて以下の実験に用いた。

1. 単純フロート法：

総数85の切片（56をルシフェラーゼアッセイに、29をX-gal組織化学に用いた）を用いた。静脈をPBSで4回洗浄し、次いで10%FBSを添加したDMEMで3回洗浄して血液を除去した。これらの静脈を長さ5～10mmの切片に切断し、種々の濃度のベクター溶液を含有する新鮮な培地中に入れた。適当な経過時点において、静脈を培養培地に浸して洗浄し、次いで各組織を6ウェルプレートに入れ器官培養を行った。

2. 管腔内への遺伝子導入：

総数71の切片を用いた。静脈は3～4cm間隔で切断して切片を作製した。弁により充填が不十分にならないように、24G針の外筒を切片の遠心側から挿入し、2-0絹糸で固定した。血管鉗子で切片の近心側を固定してから、種々の濃度のベクター溶液の約2mlを 0（暴露なし：n=24）、150 mmHg（n=11）、300 mmHg（n=9）、または760 mmHg（n=5）の連続陽圧（血圧計で測定）で管腔隙に注入し、10分間インキュベートした。いくつかの切片については、4 Fr Fogartyカテーテル（0 mmHg：n=7、150：n=6、300：n=9）で内皮を傷つけた。器官培養を48時間行った後に、これらの静脈切片を適当なレポーター遺伝子アッセイに供した。

v) ヒト静脈のX-Gal組織化学

遺伝子導入の48時間後に、静脈切片をPBSに浸して洗浄し、0.25%グルタールアルデヒドを含有する2%ホルムアルデヒドで10分間固定した。次いで、これらの切片を、0.1%Triton-Xを含有するPBSに浸して洗浄し、往復振盪機で3時間X-Gal溶液と反応させた。これらのX-Gal染色切片をリン酸緩衝ホルマリンで再度固定し、実体顕微鏡下で観察した。次いで、静脈を約5 mm間隔に切断して切片を作製し、バ

ラフィンに包埋し (1~6切片/組織)、厚さ3 μ mの切片を核ファストレッドまたは通常のヘマトキシリン-エオシンで染色して光学顕微鏡で観察した。評価した組織切片の数は表1に示した。

vi) ヒト静脈のルシフェラーゼアッセイ

遺伝子導入から48時間後に、血管切片をPBSに浸して洗浄し、1×Cell Culture Lysis 緩衝液500 μ l中ではさみで細かく切断した。細胞溶解液を4℃において15,000 rpmで5分間遠心分離し、上清の20 μ lについて上記のようにルミノメーターを用いてルシフェラーゼアッセイを実施した。

vii) 抗体および免疫組織化学

本実施例において一次抗体として使用したモノクローナル抗体を以下に示す；内皮細胞用にはCD34 (Dakopatts)、そして血管平滑筋細胞にはHHF35 (Enzo Co. Farmingdale, NY)。免疫組織化学は、標準的なアビジン-ビオチン複合体法にわずかに改良を加えて実施した (Hsu, S. M. et al., J. Histochem. Cytochem. 29, 577-580, 1981a)。簡単に説明すると、X-Gal染色し、パラフィン包埋した薄い切片を十分に脱パラフィン化してから、正常ウサギ血清 (1:10) で30分間処理して非特異的結合をブロックした。切片を4℃において一晚、一次抗体 (または陰性対照として非感作マウスIgG) と共にインキュベートした。次いで、これらの切片を0.3% H₂O₂のメタノール溶液で30分間処理して、内在性ペルオキシダーゼ活性をブロックし、ビオチン化ウサギ抗マウスIgG+IgA+IgM抗体 (Histofine SAB-PO(M)キット; Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan) と共に30分間インキュベートした。PBS中で十分に洗浄した後、切片をアビジン-ビオチン化西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体 (Nichirei Co. Ltd.) と共にインキュベートし、0.03% H₂O₂ および0.1% ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (Merck, Darmstadt, Germany) で現像した。

viii) 統計分析

全ての値は平均±標準偏差 (S.D.) として表した。データはマン-ホイットニー

(Mann-Whitney) のU-検定によって分析し、 $p < 0.05$ で帰無仮説を棄却した。

【実施例1】 組換えセンダイウイルスベクターの構築と再構成

組換えSeVは以前に記載したように構築した (Kato, A. et al., *Genes Cells* 1: 569-579, 1996; Kato, A. et al., *EMBO J.* 16: 578-587, 1997; Yu, D. et al., *Genes Cells* 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., *J. Gen. Virol.* 78: 2813-2820, 1997; Sakai, Y. et al., *FEBS Lett.* 456: 221-226, 1999)。まず、NotI制限酵素部位を有する18bpのスペーサー配列 (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3') (配列番号: 3) を、核蛋白質(N)-遺伝子の5' 非翻訳領域と開始コドンとの間に挿入した。このようにクローニングしたSeVゲノムは、デルタ型肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖由来の自己切断リボザイム部位も含有する (Kato, A. et al., *Genes Cells* 1: 569-579, 1996)。ルシフェラーゼをコードする全長cDNAおよび核局在化シグナル (NLS) を有する大腸菌lacZを、NotI部位および外来遺伝子用のSeVEおよびSシグナル配列タグのセットを有するプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅し、クローニングしたゲノムのNotI部位に挿入した。外来遺伝子を含む鋳型SeVゲノムの全長は、6塩基の倍数 (いわゆる「6の法則」) (Kolakofski, D. et al., *J. Virol.* 72: 891-899, 1998) となるようにした。外来遺伝子を含む鋳型SeVゲノムと N-、P-、およびL-蛋白質をコードするプラスミド (それぞれ pGEM-N、pGEM-P、pGEM-L) とを、市販のカチオン性脂質と共に複合体を形成させ、ワクシニアウイルスvT7-3と共にCV-1細胞またはLLMCK2細胞にコトランスフェクトした (Fuerst, T. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8122-8126, 1986)。40時間後、凍結融解を3回繰り返して細胞を破壊し、10日齢の発育鶏卵のしょう尿膜腔に注射した。その後、ウイルスを回収し、鶏卵中でもう一度増幅してワクシニアウイルスを排除した。ニワトリ赤血球細胞を用いて赤血球凝集反応によってウイルス力価を求め (Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., *Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells*. Ed. by Baker AH. *Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana*

Press: pp. 295-306, 1999)、ウイルスを含むしょう尿液を本発明の組換えウイルスベクター (SeV-NLS-lacZ) を含む組成物とし、使用時までウイルスを -80°C において凍結保存した。SeV-luc (Hasam, M. K. et al.; J. Gen. Virol. 78: 2813-2820 (1997)) を含む組換えウイルスベクター組成物も同様にして製造した。

【実施例2】 インピボおよびエキスピボにおけるSeVの用量依存的トランスフェクション

容易にトランスフェクション可能な細胞として周知の樹立細胞株COS7とヒト胎児腎細胞 (HEK293)、およびBSMCの対数増殖期の細胞を用いて、用量依存的なSeV依存性遺伝子導入を評価した。SeV-lucトランスフェクションから48時間後に、COS7およびHEK293細胞は共に、用量依存的なルシフェラーゼ発現の増加を示し、感染多重度が3 (MOI=3) より大きい力価においてプラトーに達した (データ省略)。同じ実験条件において、BSMCも用量依存的なルシフェラーゼ発現の増加を示し、図1に示すように、MOI=100でも増加し続けた (各n=6、それぞれ、未処理の対照: $46,990.57 \pm 3,849.08$ RLU/mg、野生型SeVをMOI=100で用いた疑似トランスフェクション: $4.3 \pm 0.3 (\times 10^4)$ 相対光線単位 (RLU) /mg、MOI=0.1のSeV-ルシフェラーゼ: $4.1 \pm 0.2 (\times 10^4)$ RLU/mg、MOI=1.0: $4.5 \pm 0.6 (\times 10^9)$ RLU/mg、MOI=10: $3.4 \pm 0.2 (\times 10^{10})$ 、およびMOI=100: $9.5 \pm 0.7 (\times 10^{10})$ RLU/mg)。次いで、本発明者らはSeV-NLS-lacZを用いて遺伝子導入率を評価した (各n=3、図2)。X-Gal組織化学により、青色の細胞の頻度は用量依存的に増加し、MOI=100では90%以上のBSMCが陽性となることが判明した。

次に、本発明者らは、手術の際に得られたヒト大伏在静脈を用いて、組換えSeVがヒト血管壁にトランスフェクトするかどうかを調べた。長さ5~10mmの静脈を、種々の濃度のSeV-ルシフェラーゼを含むベクター溶液に1時間入れ、培地中に浸して4回洗浄した後、直ぐに新鮮な培地で培養した (各n=6)。48時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、そのデータを図3に示した。BSMCのデータと同様に、ルシフェラーゼ活性の用量依存的な増加がはっきりと認められた (各n=6、それぞれ、

未処理の対照： $1.7 \pm 0.4 (\times 10^4)$ RLU/mg、 10^7 pfuのSeV-ルシフェラーゼ： $1.2 \pm 0.2 (\times 10^8)$ RLU/mg、 10^8 pfu： $1.2 \pm 1.0 (\times 10^9)$ RLU/mg、 10^9 pfu： $2.7 \pm 0.8 (\times 10^9)$ RLU/mg))。

【実施例3】 SeVによる *in vitro* 遺伝子導入後の時間依存的な遺伝子発現レベル

SeVを介した遺伝子導入後の時間依存的な外来遺伝子発現に関する情報を得るために、本発明者らは次いで、MOI=10のSeV-lucの処理後の各経過時点におけるBSMCのルシフェラーゼ活性を評価した（各経過時点において $n=6$ ）。図4に示すように、遺伝子導入後わずか1時間で有為なルシフェラーゼ活性が検出され、発現レベルは時間依存的に対数的に増加した（疑似： $4.6 \pm 0.4 (\times 10^4)$ RLU/mg、遺伝子導入の1時間後： $2.3 \pm 0.3 (\times 10^6)$ RLU/mg、6時間後： $1.9 \pm 0.3 (\times 10^7)$ RLU/mg、12時間後： $1.9 \pm 0.1 (\times 10^8)$ RLU/mg、および24時間後： $2.9 \pm 0.5 (\times 10^{10})$ RLU/mg)。2～3日後にかけて、ルシフェラーゼ活性はほぼプラトーに達した（遺伝子導入の2日後： $2.1 \pm 0.2 (\times 10^{11})$ RLU/mgおよび3日後： $3.7 \pm 0.2 (\times 10^{11})$ RLU/mg)。従って、以降の実施例は、通常、遺伝子導入の2日後にアッセイした。

【実施例4】 SeVを介した遺伝子導入の細胞増殖に対する影響

次に、本発明者らは、SeVを介した遺伝子導入のBSMC増殖に対する効果をアッセイし、BSMCに対するベクターの毒性を評価した。図5に示したように、BSMCの増殖はMOI=100までにおいて野生型SeVの感染により阻害されることはなかった。しかしMOI=1,000の8日目においては、明らかな増殖阻害が認められた（ $p < 0.01$ ）。

【実施例5】 外来遺伝子発現の時間経過

SeVを含むパラミクソウイルス群は、細胞質内でゲノムを複製し、それらの遺伝子を発現する。これは娘細胞における安定なレポーター遺伝子の発現を示唆している。しかし、欠損干渉（defective interfering; DI）作用を有するゲノムまたは自然発生による突然変異の蓄積の可能性により、治療用遺伝子の発現レベルが影響されることがありうる（Calain, P. et al., Virology 212: 163-73, 1995）。

これを調べるために、本発明者らは、増殖中の細胞または静止期の細胞を使用して、以下の一連の実験において、SeV-lucを介した遺伝子導入後のレポーター遺伝子発現の時間経過を評価した。

最初に、75mm²フラスコ中で対数的に増殖中のBSMCに、SeV-lucをMOI=0.1、1および10で感染させた。各経過時点において、細胞の3/4についてルシフェラーゼアッセイを実施し、残りの1/4を継代して培養した。その結果、BSMCでは、3種類のdose（用量）において、37日目まで高いレベルのルシフェラーゼの発現が持続し、比較的安定したルシフェラーゼの発現が見られた（図6a）。この実験は3回繰り返し、同様の結果を得た。

次に、本発明者らは以下のように、静止期のBSMCを使用して、レポーター遺伝子の発現の時間経過を評価した。細胞をコンフルエントな（密集した）状態で2日間より長い時間放置し、細胞周期を停止させ、FACScanによりBSMCの95%より多くがG1/G0期になるようにした（データ省略）。静止期のBSMCにMOI=0.1、1.0、10の力価でSeV-lucを1時間暴露し、各経過時間において、細胞のルシフェラーゼアッセイを行った（n=6、図6b）。外来遺伝子の発現は2日目が高く（ $1.1 \pm 0.4 \times 10^{11}$ RLU/mg）、日数の経過と共に徐々に低下し、14日目では、ルシフェラーゼ活性は最低値になった（ $2.1 \pm 0.8 \times 10^{10}$ RLU/mg）。その後ルシフェラーゼ活性は再び徐々に増加し始め、少なくとも28日目まで増加した。これらの結果から、SeVを介した遺伝子発現は比較的高レベルで少なくとも1箇月以上持続することが示唆された。

【実施例6】BSMCおよびヒト伏在静脈へのSeVを介した遺伝子導入におけるベクター暴露時間の影響

現在の遺伝子導入ベクターの臨床応用の障害となる主な制約の1つは、比較的長時間ベクターを暴露させなければならないことであると思われる。SeVを介した遺伝子導入系においてこれを検討するため、本発明者らは、増殖を停止させたBSMCおよびヒト伏在静脈を用いて、暴露時間依存的な遺伝子導入効率を評価した。

BSMC細胞については、細胞を6ウェル培養プレートに入れ、コンフルエントになった後2日間培養した。FACScanにより、BSMC細胞の95%より多くがG1/G0期であることを確認した(データ省略)。SeV-luc (MOI=10)を各ウェルに添加し、1、2、5、10、30、60、180分、24および48時間後に培地を除去し、新鮮な培地で2回洗浄し、10%FBSを添加したDMEM 2mlを各ウェルに入れた。トランスフェクションの48時間後に、上記のようにしてルシフェラーゼアッセイを行った。

興味深いことに、SeVの場合は、図7aに示すように、ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、ベクターと細胞の相互作用時間によりあまり影響されず、わずか1分暴露するだけで、48時間暴露と同様のレベルのルシフェラーゼ活性を発現するのに十分であった(それぞれ、n=6)。

これらの所見は、ヒト伏在静脈(図7b)においても代表的に観察され、BSMCを用いて SeV-NLS-lacZを導入した場合でも同様であった。図7b等にも示されるように、ベクター溶液でわずか1分処理するだけで、48時間処理と同様のルシフェラーゼ活性を得るのに十分であった。これらの結果は、ベクターと細胞との相互作用時間は、SeVにとって重要な制限因子ではないことを示している。

これに対し、lacZをコードするアデノウイルスを同じ条件で試験した場合は、以前に報告されているように(Guzman, R. J. et al., Circulation 88: 2838-2848, 1993)、遺伝子導入活性はベクターとのインキュベーション時間に依存していた(図8)。

[実施例7] ヒト伏在静脈に対する遺伝子導入効率

ヒト血管においてSeVを介して遺伝子が導入される正確な細胞種を調べるため、除去手術において静脈瘤患者からヒト大伏在静脈を得た。これらの血管を用いることの利点は；1) 種々の程度の筋線維性新生内膜を有するヒトの疾患血管を入手できること、2) 大量の血管を入手することが容易であること、そして、3) 頻発する細菌による汚染を回避できることである。これらの血管を用いることの欠点は；1) 手術手技によるECの喪失が起き易いこと、および2) 静脈壁の重度

の線維形成と中膜細胞の減少である。

まず、本発明者らは、種々の注入圧による管腔内遺伝子導入を評価した。SeV-NLS-lacZ (5×10^8 pfu) 2 mlを3~4cmに切断した静脈内に0、150mmHg、300mmHg、または760mmHg (各n=6) の注入圧で10分間注入した。また、バルーンカテーテルによって損傷させた血管を用いて、同じ圧力でベクター溶液を注入した (n=6)。対照の血管には野生型SeVを注入した (n=6)。遺伝子の発現は遺伝子導入の48時間後にX-Gal染色によって評価した。

静脈中の細胞のバイアビリティ（生存率）をヘマトキシリンによる核の明らかな染色により評価した（表1）。なお、760 mmHgの注入圧をかけると、5つの切片の全てでCD34陽性ECとHHF35陽性VSMCの明確な減少が見られたことから、このグループの細胞は以下の評価から除外した。また、バルーン傷害群では、血管内腔表面に重度の損傷を認めたため、管腔側のECについては評価から除外した。他の条件における細胞数の平均は、全て有意差はなかったことから、これらのグループについてX-gal染色の評価を行った。

ヒト大伏在静脈の細胞のバイアビリティー

	損傷させていない静脈				バルーンで損傷させた静脈			単純フロート法 平均細胞数/切片 (範囲) (n=20)
	平均細胞数/切片 (範囲)	0 mmHg (n=36)	150 mmHg (n=24)	300 mmHg (n=22)	760 mmHg (n=5)	0 mmHg (n=6)	150 mmHg (n=3)	300 mmHg (n=19)
CD34 (+) ECs* (管腔)	31.1 (0-277)	61.6 (0-235)	9.1 (0-68)	0.2 (0-1)	(-)	(-)	(-)	10.0 (0-46)
HHF35 (+) VSMCs** (新生内膜)	129.1 (25-385)	77.0 (23-132)	85.3 (20-238)	34.5 (2-67)	170.3 (78-253)	57.3 (46-53)	112.1 (43-233)	132.2 (55-225)
HHF35 (+) VSMCs (中膜)	20.0 (9-56)	18.8 (4-45)	21.5 (7-66)	9.3 (3-37)	27.0 (22-32)	22.3 (13-32)	36.6 (12-81)	20.9 (9-42)
外膜	212.0 (46-472)	212.2 (86-548)	197.3 (30-374)	139.2 (110-159)	247.5 (130-433)	109.3 (90-132)	139.3 (30-230)	177.9 (132-288)

*ECs: 内皮細胞,

**VSMCs: 血管平滑筋細胞

表 1

種々の注入圧でSeV-NLS-lacZに暴露した血管の観察により、管腔面と外膜に拡散した濃い青のスポットが高頻度に存在することが判明した(図9aおよびb)。野生型SeVに暴露した血管には、青いスポットは認められなかった(図9c)。組織学的な試験により、これらの細胞のほとんどは管腔表面および血管の脈管(vasa vaora)のEC、並びに外膜の線維芽細胞であることが示された(図9dおよびe)。このことは、免疫組織化学によっても裏づけられた(データ省略)。

バルーンで損傷させた血管では、管腔面の青いスポットの数は顕著に減少したが(図10a)、外膜については、血管の脈管を含め、未損傷の血管と同様の頻度の青色スポットが認められた(図10b、矢尻)。これらの結果は組織化学によって裏付けられた；薄い新生内膜を有する血管では、青く染色された核を有する細胞はまばらに散在していたが(図10c、矢尻)、厚い新生内膜を有する血管では、散在する毛細管のECを除いて、ごく少数観察されただけであった(図10dおよびe、矢印)。新生内膜がさけた血管の一部では比較的高頻度の中膜細胞がX-Galに陽性であったことから、SeVベクターの血管SMC(平滑筋細胞)に対する導入効率は、必ずしも低い訳ではないと思われる(図11fおよびg、矢印)。これらの結果は、新生内膜はヒト血管へのSeVを介した遺伝子導入の大きな障壁であるが、ECはそうではないことを示唆している。

組織切片は続いて免疫組織化学に供し、内膜、中膜、および外膜のX-Gal陽性細胞の割合を定量した(表2)。損傷させていない静脈に対するSeVを介した遺伝子導入の効率は、どの注入圧においても、単純フロート法による試料の場合とほぼ同じであったが、損傷させた静脈では、300 mmHgにおいて新生内膜での遺伝子導入細胞数がやや増加した。それに加え、新生内膜を裂傷させた場合、300 mmHgにおいて、中膜と外膜の両方でX-gal陽性細胞の明らかな増加が検出された。これは、図11fおよびgに示した組織学的データを裏付けている。裂傷を受けた試料においても、新生内膜への遺伝子導入効率は以前として低く、新生内膜領域のベクターの透過性は低いことが示唆された。

表 2

ヒト大伏在静脈の ex vivo 遺伝子導入効率

	損傷させていない静脈 %青い細胞/全細胞±S. D.			バルーンで損傷させた静脈 %青い細胞/全細胞±S. D.			300 mmHgで裂傷 させた材料 %青い細胞/全細胞 ±S. D. (n=4)	単純フロート法 %青い細胞/全細胞 ±S. D. (n=20)
	0 mmHg (n=36)	150 mmHg (n=24)	300 mmHg (n=22)	0 mmHg (n=6)	150 mmHg (n=3)	300 mmHg (n=19)		
CD34 (+) ECs* (管腔)	91.6±13.0	89.5±13.7	94.2±9.1	(-)	(-)	(-)	79.2±24.1	92.3±11.8
HHF35 (+) VSMCs** (新生内膜)	3.8±4.0	15.4±16.1	2.3±4.0	1.7±3.0	0	26.3±5.0	2.2±3.8	1.5±1.2
HHF35 (+) VSMCs (中膜)	4.0±13.9	0	0	0	0	5.0±15.8	40.2±38.5	0
外膜	17.7±14.3	26.7±20.5	36.7±21.2	15.7±12.8	3.0±4.0	29.3±24.4	78.1±9.0	20.5±38.5

*ECs: 内皮細胞,

**VSMCs: 血管平滑筋細胞

[実施例 8] ウサギ頸動脈に対する in vivo 遺伝子導入

雄日本白色種家兎 2.5-3.5 kgを用い、pentobarbital麻酔下に頸部を正中切開で皮膚切開し、頸動脈を露出した。中膜を取り囲むようにシースになっている血管外膜を先の細いピンセットで摘み上げ、26ゲージの注射針で中膜を刺さないように、適量のセンダイウイルスベクター (SeV-NLS-lacZ; 5×10^7 pfu) (通常約 500 μ l) を注入し、傷口を縫合した。

遺伝子導入の2日後に再度pentobarbital麻酔下に傷を開き、18ゲージのエラスターを外頸動脈より挿入、内腔をヘパリン入り生理食塩水で洗浄したのち切除し、固定液 (2%パラホルムアルデヒド + 0.25%グルタルアルデヒド) で10分間固定した。PBSで充分洗浄後、X-gal溶液に血管壁を浸し、震蕩器の上で室温で3時間反応させた。3時間後、血管壁は大量のPBSで洗浄し、中性ホルマリンで再固定し、組織切片を作成した。その結果、外膜の細胞核が青く染色され、センダイウイルスベクターによる血管細胞への遺伝子導入が、インビボにおいても有効であることが示された (図12)。

同様にして、下肢バイパスグラフト血管壁、および心臓の冠状動脈等に遺伝子導入を行うことも可能である。

また、陽圧をかけた管腔内注入は、例えば以下のように行うことができる。ウサギに用いる場合、日本白色種家兎を pentobarbital + ketaminで麻酔し、頸部に正中切開を加え、右総頸動脈、内頸動脈、外頸動脈を露出させる。総頸動脈より出る分枝血管を結紮、総頸動脈を心臓側、内頸動脈を頭側で遮断する。外頸動脈壁に小さなハサミで穴をあけ、18ゲージのダブルルーメンカテーテルを内系動脈に向けて留置する。カテーテルの注入部を開放し、もう一つの注入部からバッファを約5 cc注入、血液成分を十分に洗い流す。カテーテルの注入部を閉鎖し、もう一つの注入部に血圧計を接続する。血圧計との接続チューブにつけた三方活栓からウイルス液を注入し、血管内腔を満たす。注入部を閉鎖、血圧計により任意の血圧 (通常 150 mmHg) の圧をかけ、10分間放置する。ウイルス液を回収、カ

テールを抜去し、外頸動脈を結紮する。総頸動脈、内頸動脈の遮断を開放し、血流を再開する。

〔実施例 9〕 ラット胸部動脈への ex vivo センダイウイルスベクターの導入
ラット動脈へのセンダイウイルスベクターの遺伝子導入をラット胸部動脈を用いて ex vivo で調べた。ウイスターラット（チャールズリバー）9-12週令 雄 を用いた。ラットをネンブタール麻酔を行い、開腹し、胸部大動脈を切り出した。Hanks solution (GIBCO BRL) によって、血管を洗浄し、管状のものを縦切りし、板状にした。約 4×5 mm の板状に血管を細断した。Hanks solution で洗浄後、GFP を発現する GFP/SeV もしくは SeV-NLS-lacZ を示された濃度に溶かした Hanks solution につけた。10 分後、2 回 Hanks solution で洗浄し 10% FBS (GIBCO BRL) を含んだ DMEM (GIBCO BRL) で 5% CO₂ インキュベーターで培養した。一日後、同培地を交換し、さらに 1 日後、 β -gal staining kit (Invitrogen) によって固定、染色した。染色時間は 3 時間とした。細胞数をカウントし、後固定後、凍結切片の作製、および、パラフィン切片の作製を行った。

凍結切片の場合、 β -gal staining kit で染色後、OCT compound (Tissue-Tek) で包埋した。さらにクリオスタットで 6 μ m 切片を作製し、ヌクレオファーストレッド（和光純薬 142-04331）で後染色した。パラフィン切片の場合、 β -gal staining kit で染色後、10% ホルマリンで後固定した。エタノール脱水、透徹、パラフィン包埋した後、ミクロトームで、4 μ m 切片を作製した。

上記実施例に示した血管培養細胞およびヒト大伏在静脈と同じく、濃度依存的にベクターの遺伝子導入効率が上昇し（図 1 3 a）その感染時間は 2 分間でプラトーに達した（図 1 3 b）。また、アデノウイルスベクターとの比較においても、その導入は低い濃度で、高効率の導入が見られた（図 1 3 c）。

〔実施例 10〕 プロテアーゼ処理による感染効率の上昇と血管中膜への導入
パラミクソウイルスベクターの可能性を拡大するために、プロテアーゼ前処理することによって、ベクター導入の障壁となる細胞外マトリクス (ECM) を分解し

て、PTCA後再狭窄や動脈硬化の原因となる血管内皮細胞より内側にあるマクロファージや平滑筋細胞への遺伝子導入を目指した。どのプロテアーゼを選択すれば血管中膜への導入が促進されるか調べるために、さまざまなプロテアーゼで5分間前処理したのち、センダイウイルスベクターを導入した。酵素は血管内皮細胞へ導入が限局されることより、基底膜分解酵素および血管へ臨床応用されている酵素を中心に選択した。ラット胸部動脈を実施例9と同様に単離、細断し、Hanks solution もしくは、10% FBS (GIBCO BRL) 添加Hanks solutionに以下のプロテアーゼを加えてを37℃ 5分間インキュベーションを行った。コラゲナーゼ type 4 (ICN) 500 unit/ml、ウロキナーゼ (コスモバイオ) 500 unit/ml、tPA (calbiochem) 500 unit/ml、エラスターゼ (コスモバイオ) 500 unit/ml、プラスミン (コスモバイオ) 50 μ g/ml、active-MMP2 (コスモバイオ) 100ng/ml、active-MMP9 (コスモバイオ) 100ng/ml。処理前に、溶液が37℃になるように37℃で10分間暖めておいた。2回 Hanks solutionで洗浄後、Hanks solution でGFP/SeV もしくは SeV-NLS-lacZ を示された濃度に溶かした溶液につけた。2分後、2回 Hanks solutionで洗浄し10% FBS (GIBCO BRL) を含んだDMEM (GIBCO BRL) で5% CO₂インキュベーターで培養した。一日後、同培地を交換し、さらに1日後、 β -gal staining kit (Invitrogen) によって固定、染色した。染色時間は3時間とした。細胞数をカウントし、後固定後、実施例9と同様に凍結切片の作製、および、パラフィン切片の作製を行った。

図14で示すように、コラゲナーゼ、ウロキナーゼ、tPA、MMP9、MMP2、エラスターゼ、ともに 1×10^7 pfu/mlの濃度で感染させた場合、その感染効率が2～5倍上昇した。図15は図14で示したものの切片像をあらわしている。切片像より、コラゲナーゼ、MMP9、MMP2で動脈中膜の平滑筋細胞まで導入が可能になっているのがわかった。これらの酵素は基底膜を分解基質としていて、とくにMMP9およびMMP2は弾性線維の構成成分であるエラスチンも分解可能であることから、効果が高いと考えられる。一方、tPA単独では中膜までの導入が起こらないが、血清を加

えることによって、中膜までの導入がみられるようになった。これは血清中のプラスミノゲンがプラスミンに分解されたためだと考えられる。

【実施例 1 1】 プロテアーゼ処理によるラット血管中膜への *in vivo* センダイウイルス導入

in vivo におけるプロテアーゼ処理による効果をラット腹部大動脈と頸動脈へのベクター導入によって検証した (図 1 6)。ともに *ex vivo* で効果のあったコラゲナーゼタイプ 4、MMP9、MMP2 と、さらに tPA + 10% FBS の代わりにプラスミンを用いて、前処理を行った (図 1 6 A, B, C, D)。頸動脈では、臨床時の簡便さを考慮して、事前に混合し、投与することを試みた (図 1 6 E, F)。

ラット腹部大動脈への *in vivo* センダイウイルスベクター遺伝子導入では、ラットをネンブータルにて麻酔後、開腹し、腹部大動脈を露出させた。腹部大動脈をクリップで止め血流を止めた。支流もクリップで止められないようにした。インシュリン用注射針 (TERMO) で、血管内に 25 μ l のプロテアーゼを注入した。プロテアーゼは上記の *ex vivo* と同様の酵素および濃度を使用した。綿棒で押さえて、止血しながら、37°C、5 分間インキュベーションした。50 μ l の生理食塩水によって、同じく、インシュリン用注射針にて洗浄した。25 μ l SeV-NLS-lacZ (1×10^9 pfu/ml) を血管内に注入した。綿棒で押さえながら、2 分間インキュベートした。クリップをはずし、血流を再開させた後、縫合した。3 日後、再度開腹し、感染させた部分を切り出した。LacZ 染色を行った。

ラット頸動脈への *in vivo* センダイウイルスベクター遺伝子導入では、ラットをネンブータルにて麻酔後、ラット下肩の下に枕を入れ、下顎部を伸展させた。総頸動脈、内外頸動脈を剥離し、分岐をすべて結索、切離した。外頸動脈を 1 cm 程度流部より離して結索し、それぞれすべて遮断した。外頸動脈より 24G エラスター針の外筒を挿入、ヘパリン生理食塩水で内腔を充分洗った後、糸でカテーテルを固定した。プロテアーゼ 10 μ l を注入し、5 分間インキュベーションした。生理食塩水で洗浄した。SeV-NLS-lacZ (1×10^9 pfu/ml) 10 μ l を注入した。2 分間イン

キューベーションの後、外筒を抜き、針穴の中枢部を結索した後、血行を再開し、縫合した。3日後、固定液（1%パラホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド添加生理食塩水）で環流固定後、再度開腹し、感染させた部分を切り出した。 β -galactosidase染色キットでLacZ染色を行った。同時投与の場合、上記のプロテアーゼとセンダイウイルスをファイナルの濃度がそろうように別々に等量ずつ37°Cで10分間暖めておき、導入時に混合し、血管をいれた。5分間浸潤投与後、2回 Hanks solution によって洗浄した。以下は実施例9と同様に行った。

未処理のものでは、血管内皮細胞のみしか導入がみられないが、使用したコラゲナーゼタイプ4、MMP9、MMP2、プラスミンで前処理したものでは、血管中膜へのセンダイウイルスベクターの遺伝子導入がみられた。ラット頸動脈の場合、同様に総頸動脈へ導入したが、Fでは生理食塩水で洗浄後、コラゲナーゼタイプ4 (final 500unit/ml) と SeV-NLS-lacZ (final 1×10^9 pfu/ml) を等量混合した溶液 10 μ lの同時投与を行った。5分後、血流を再開した。3日後、導入した血管を切除し、 β -galactosidase 染色キットで固定、染色した。未処理のものでは、血管内皮細胞のみにセンダイウイルスベクターは遺伝子導入されるが、これらの酵素を前処理することによって、中膜への感染が可能になった。また、同時投与の実験でも中膜への遺伝子導入がみられた。

【実施例12】 プロテアーゼ処理によるヒト大伏在静脈へのex vivo センダイウイルス導入

下肢静脈瘤患者より手術時に献体を受けたヒト大伏在静脈を用いて、プロテアーゼ処理による新生内膜へのex vivo センダイウイルスベクター遺伝子導入を試みた。得られた大伏在静脈から脂肪を除去し、管状の血管を1cm×1cmの板状に細断した。Hanks solution によって、血管を洗浄した。Hanks solution に上記のプロテアーゼを加えてを37°C 5分間行った。処理前に、溶液が37°Cになるように37°Cで10分間暖めておいた。2回 Hanks solution 洗浄後、Hanks solution で SeV-NLS-lacZ を 5×10^8 pfu/ml に溶かした溶液につけた。2分後、2回 Hanks

solutionで洗浄し10% FBS (GIBCO BRL) を含んだDMEM (GIBCO BRL) で5% CO₂インキュベーターで培養した。一日後、同培地を交換し、さらに1日後、 β -gal staining kit (Invitrogen) によって固定、染色した。染色時間は3時間とした。細胞数をカウントし、後固定後、パラフィン切片の作製を行った。

ラット動脈と同様に、未処理のものでは血管内皮細胞にその導入が血管内皮細胞へ導入が限局していた (図17A)。MMP2, プラスミンで処理したもので、基底膜下の新生内膜への導入が可能になった (図17B, C)。上記実施例のラットで試みた酵素についてはすべて試みたがMMP2, プラスミン以外は顕著な効果はみられなかった。その理由として、ラット動脈と異なって、下肢静脈瘤の患者由来のヒト大伏在静脈は、基底膜下の層が厚く、肥厚しており、ラット動脈とは構造がかなり異なっている。また、その細胞外マトリックス成分も異なり、フィブリンの繊維もみられる。そのため基底膜とフィブリンを基質にするプラスミンの効果が高かったと考えられる。

産業上の利用の可能性

血管細胞への遺伝子導入においては従来のベクターでは十分な遺伝子導入効率を得られなかったが、本発明により、パラミクソウイルスベクターを利用して短時間で効率よく血管細胞へ遺伝子導入することが可能となった。これにより、血管細胞などを標的とした遺伝子治療のための1つの基盤技術が提供された。

請求の範囲

1. 組換えパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を血管細胞へ接触させる工程を含む、血管細胞へ核酸を導入する方法。
2. 下記 (a) および (b) に記載の工程を、(a) (b) の順または同時で行うことを含む、血管細胞へ核酸を導入する方法。
 - (a) 血管細胞を含む組織をプロテアーゼで処理する工程。
 - (b) 組換えパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む細胞を血管細胞へ接触させる工程。
3. プロテアーゼがコラゲナーゼ、ウロキナーゼ、エラスターゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、プラスミン、マトリックスメタロプロテイナーゼからなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。
4. 組換えパラミクソウイルスベクターに含まれる核酸が外来遺伝子を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。
5. 血管細胞が血管内腔の内皮細胞、血管の脈管（血管壁栄養血管）の内皮細胞、血管中膜の血管平滑筋細胞、および外膜の細胞からなる群より選択される、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。
6. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。
7. 血管細胞へ核酸を導入するために用いる、組換えパラミクソウイルスベクター。
8. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項 7 に記載のベクター。
9. 組換えパラミクソウイルスベクターに含まれる核酸が外来遺伝子を含む、請求項 7 または 8 に記載のベクター。
10. 血管細胞が血管内腔の内皮細胞、血管の脈管（血管壁栄養血管）の内皮細胞、血管中膜の血管平滑筋細胞、および外膜の細胞からなる群より選択される、

請求項 7 から 9 のいずれかに記載のベクター。

- 1 1 . 請求項 7 から 1 0 のいずれかに記載の組換えパラミクソウイルスベクターを含む、血管細胞への遺伝子導入用組成物。
- 1 2 . 請求項 7 から 1 0 のいずれかに記載の組換えパラミクソウイルスベクターおよびプロテアーゼを含む、血管細胞への遺伝子導入用キット。
- 1 3 . プロテアーゼがコラゲナーゼ、ウロキナーゼ、エラスターゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、プラスミン、マトリックスメタロプロテイナーゼからなる群より選択される、請求項 1 2 に記載のキット。

1 / 17

図 1

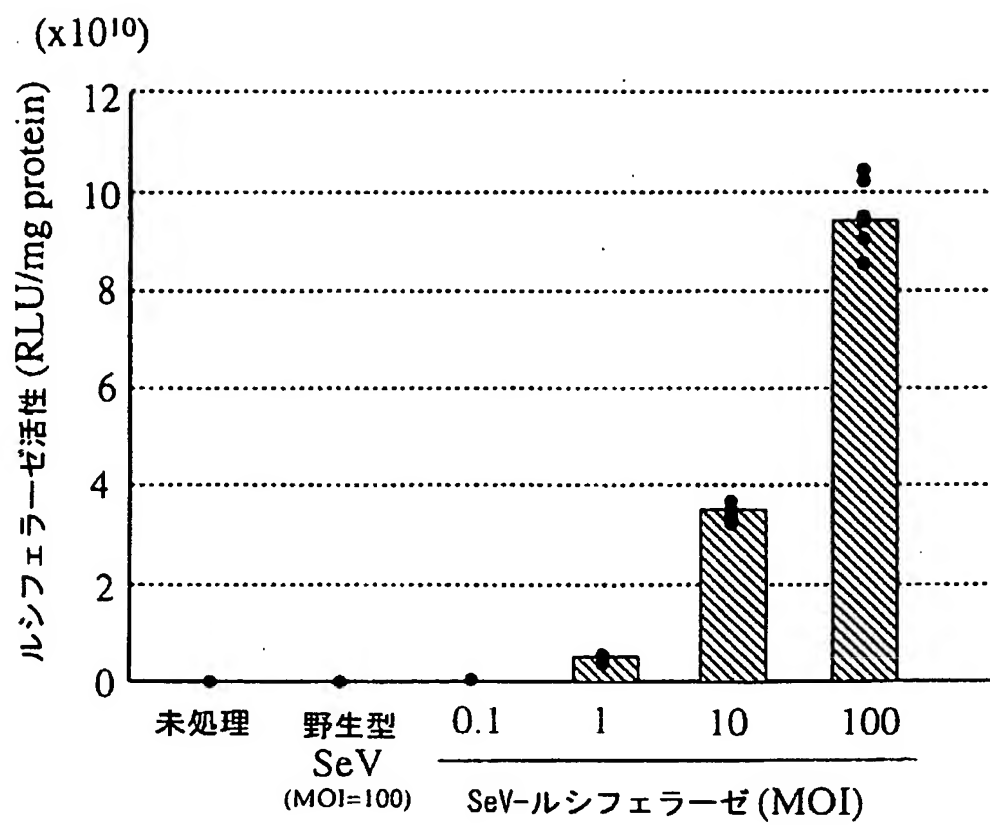


図 2

2 / 17

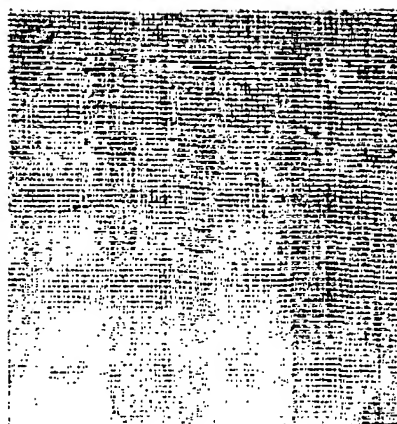
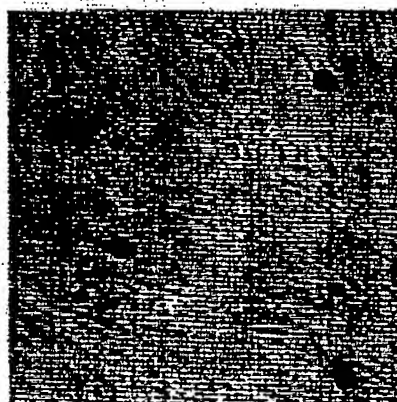
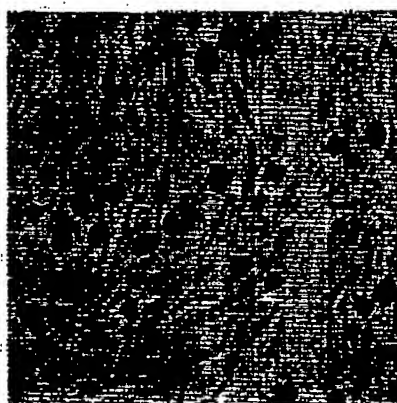
SeV-NLS-lacZ

MOI=100

MOI=10

MOI=1

Mock



3/17

図 3

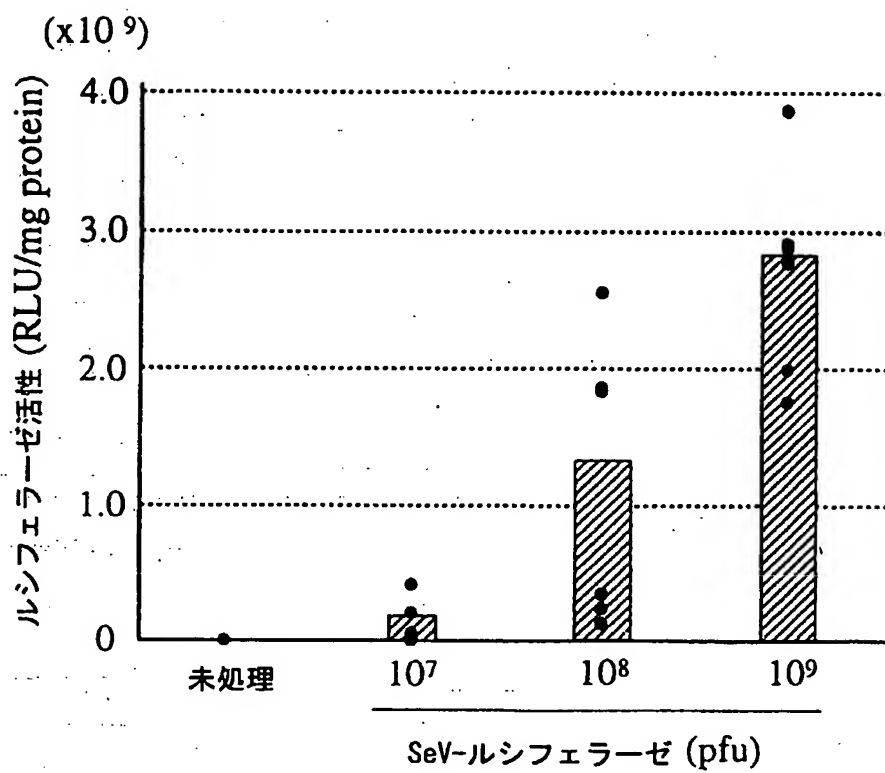


図 4

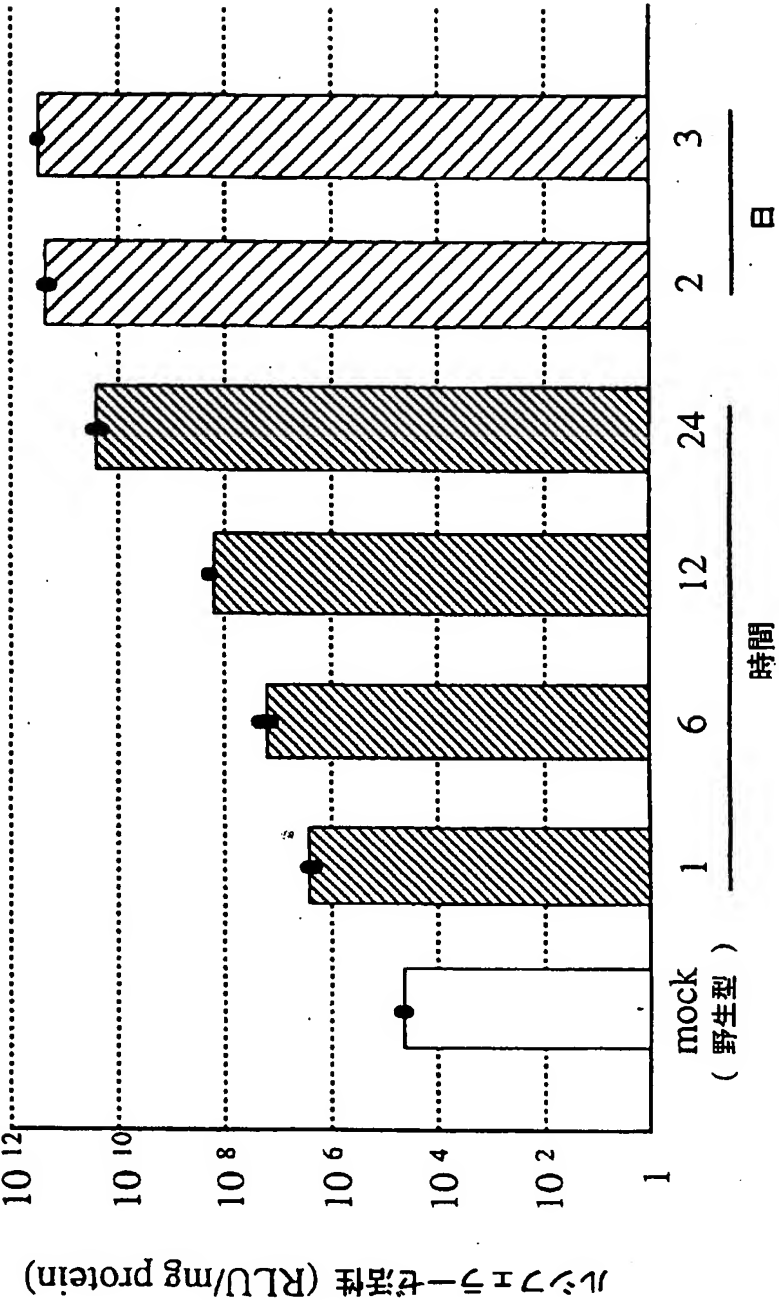
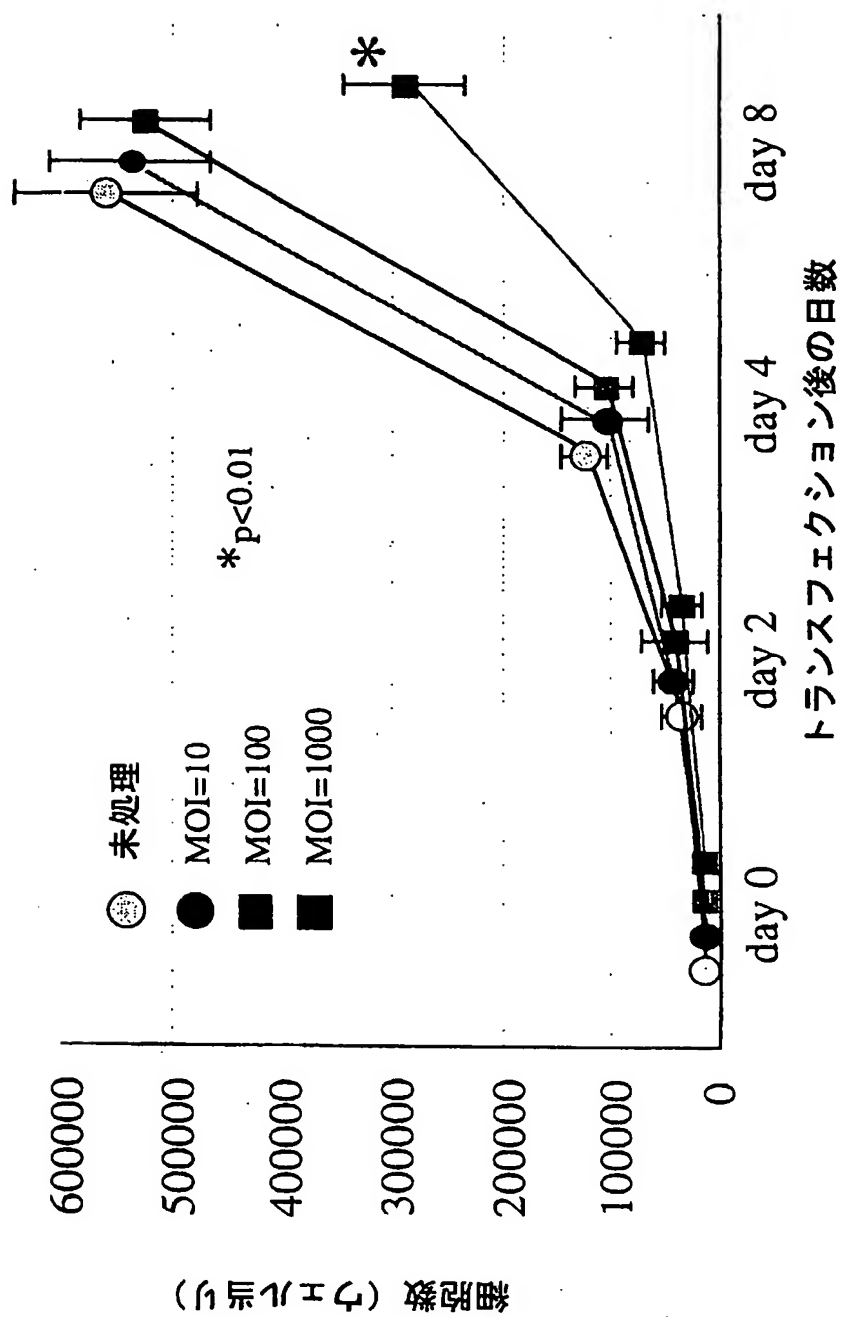


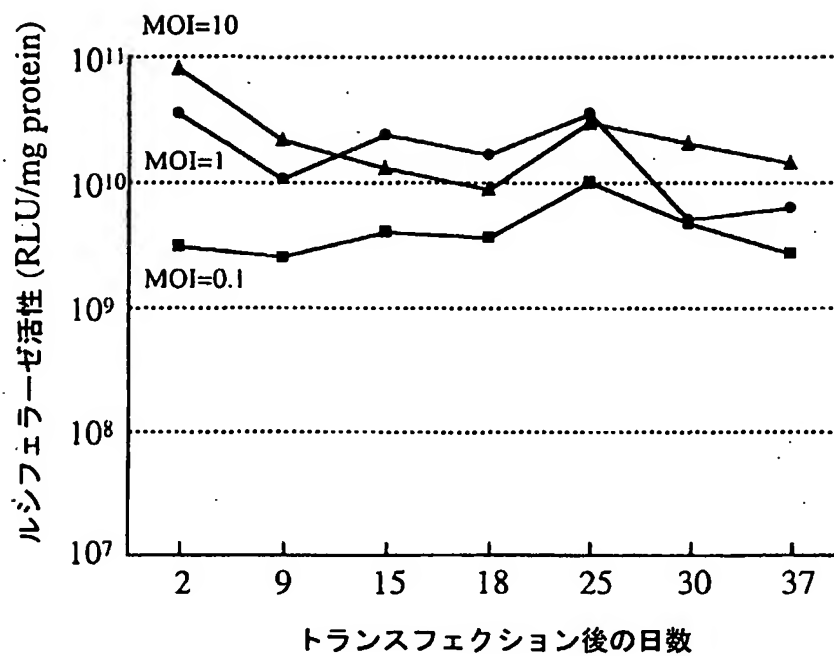
图 5



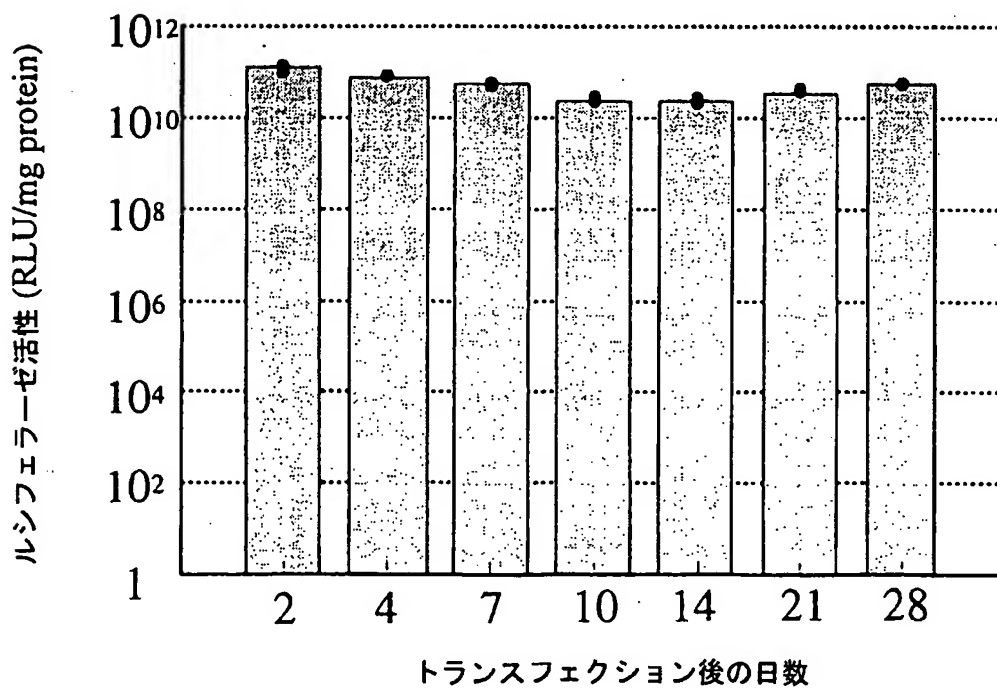
6/17

図 6

a.



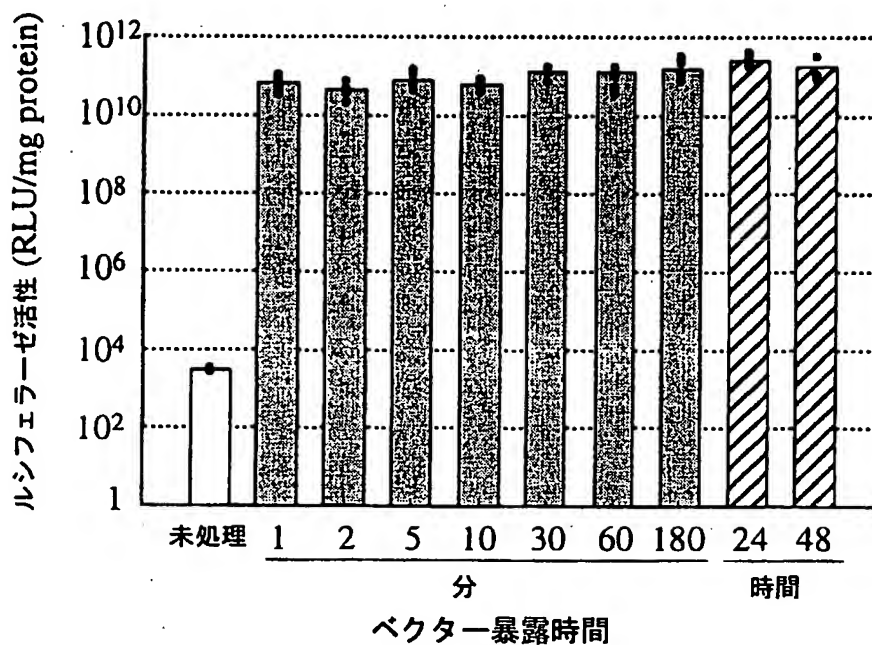
b.



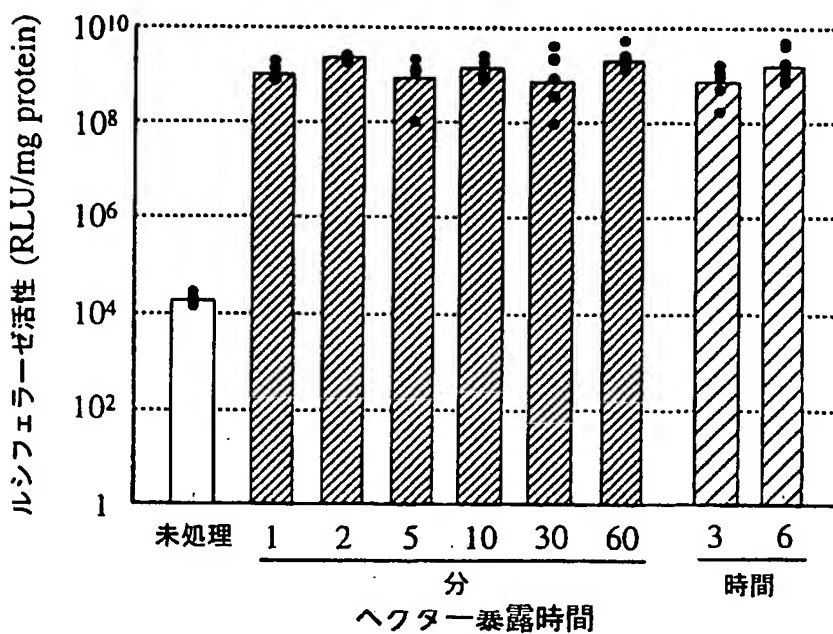
7/17

図 7

a.



b.



8/17

図 8

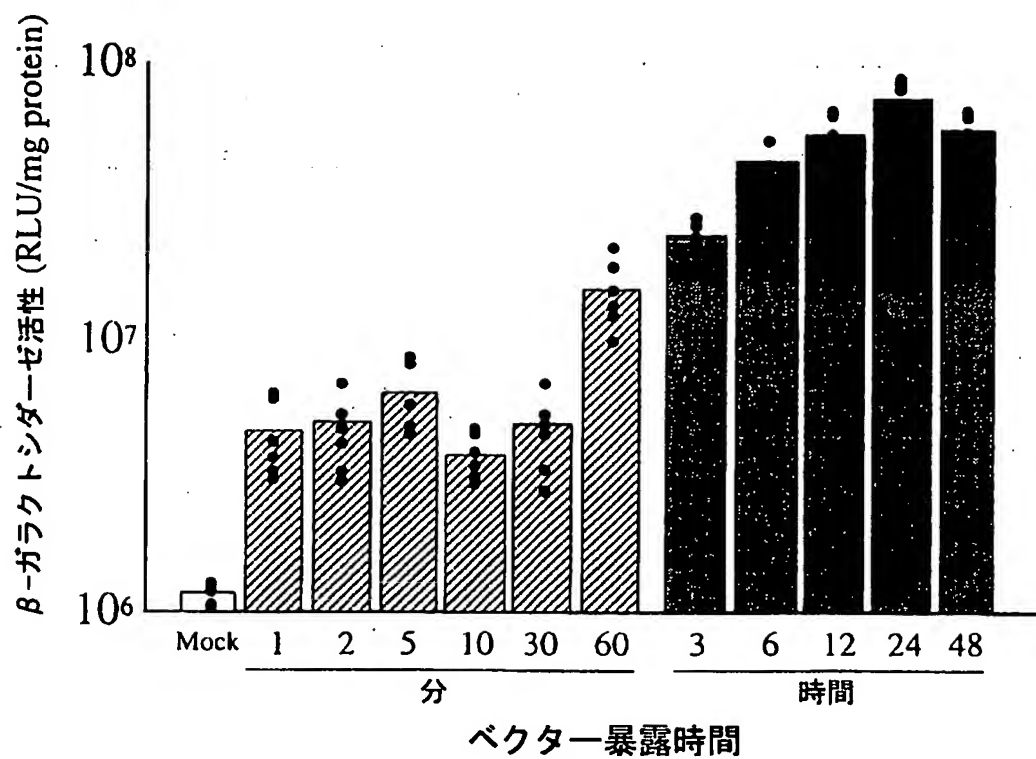


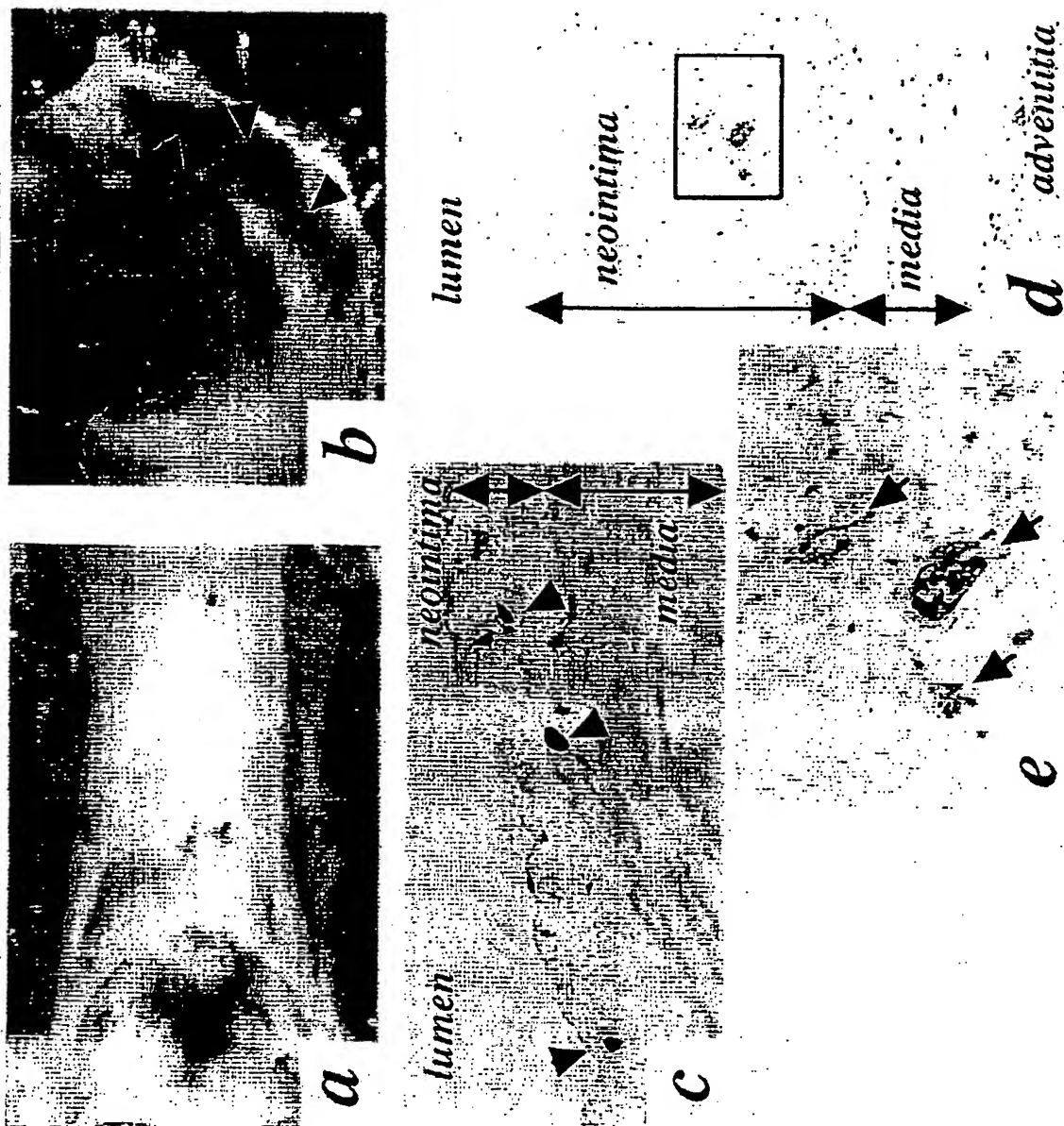
図 9



lumen: 管腔; *neointima*: 新生内膜; *media*: 中膜; *adventitia*: 外膜

10/17

10



lumen: 管腔; *neointima*: 新生内膜; *media*: 中膜; *adventitia*: 外膜

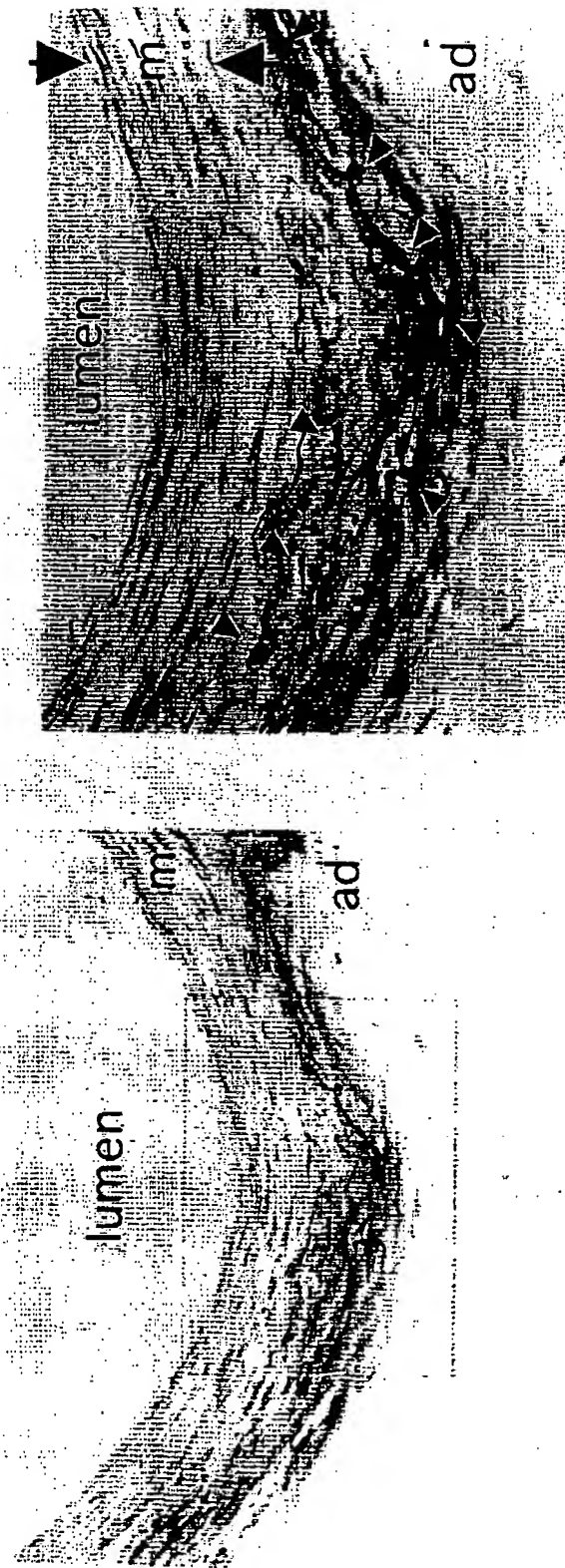
図 11



lumen: 管腔; *neointima*: 新生内膜; *media*: 中膜; *adventitia*: 外膜; *tesr*: 裂傷

12/17

図 12

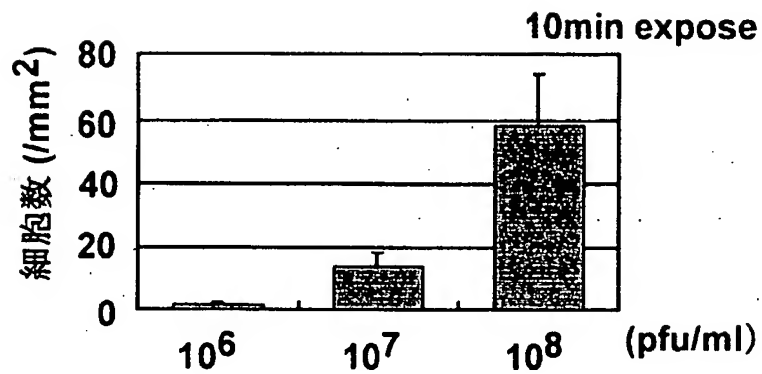


lumen: 管腔; m: 中膜; ad: 外膜

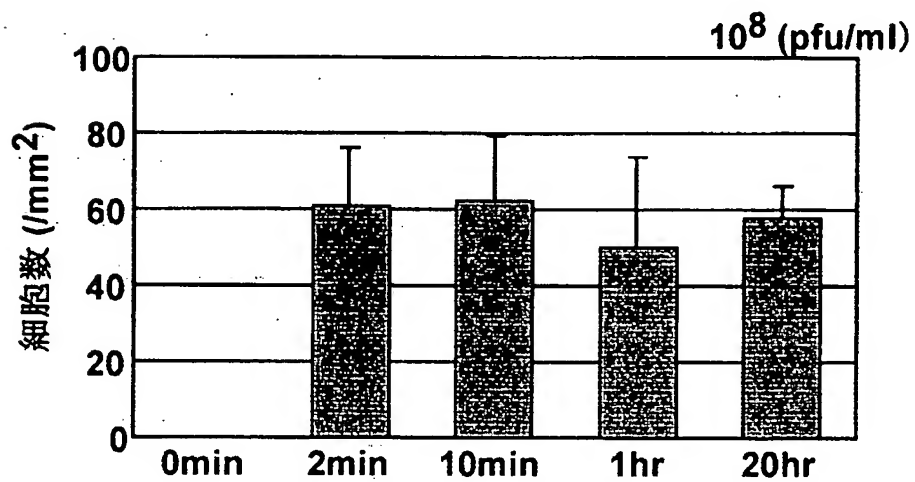
13/17

図 13

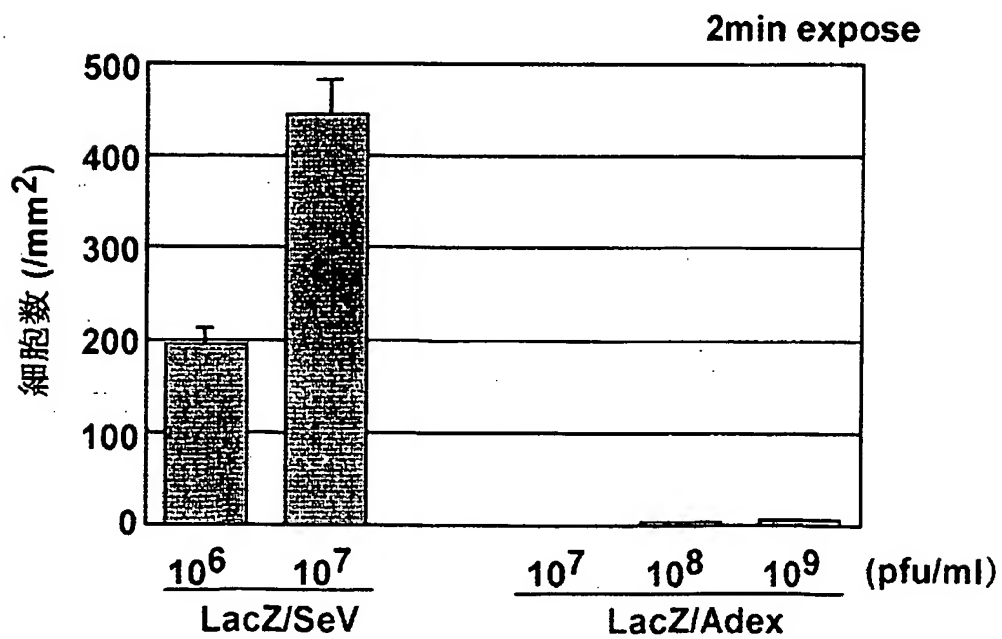
a)



b)

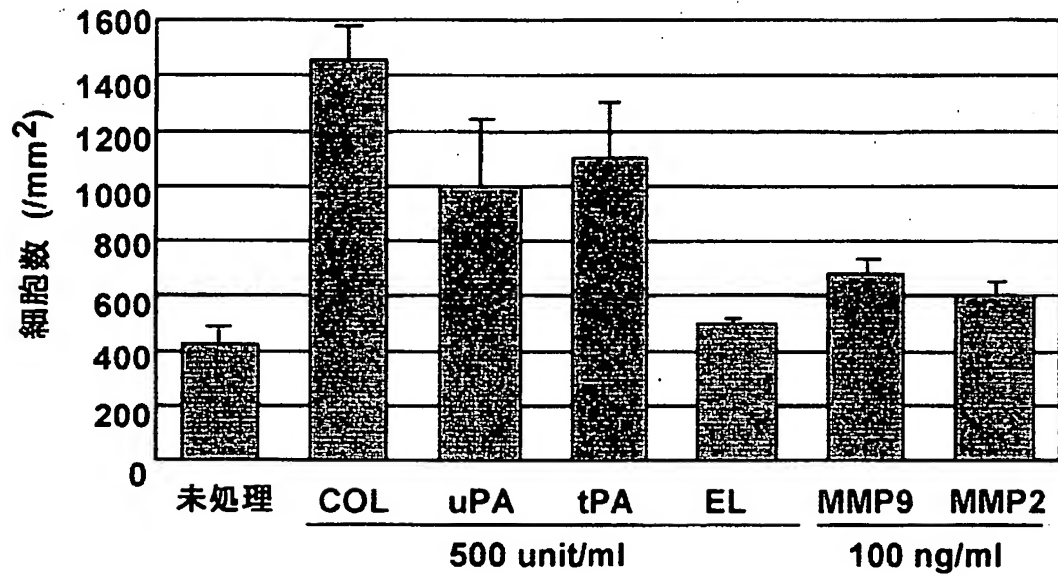


c)



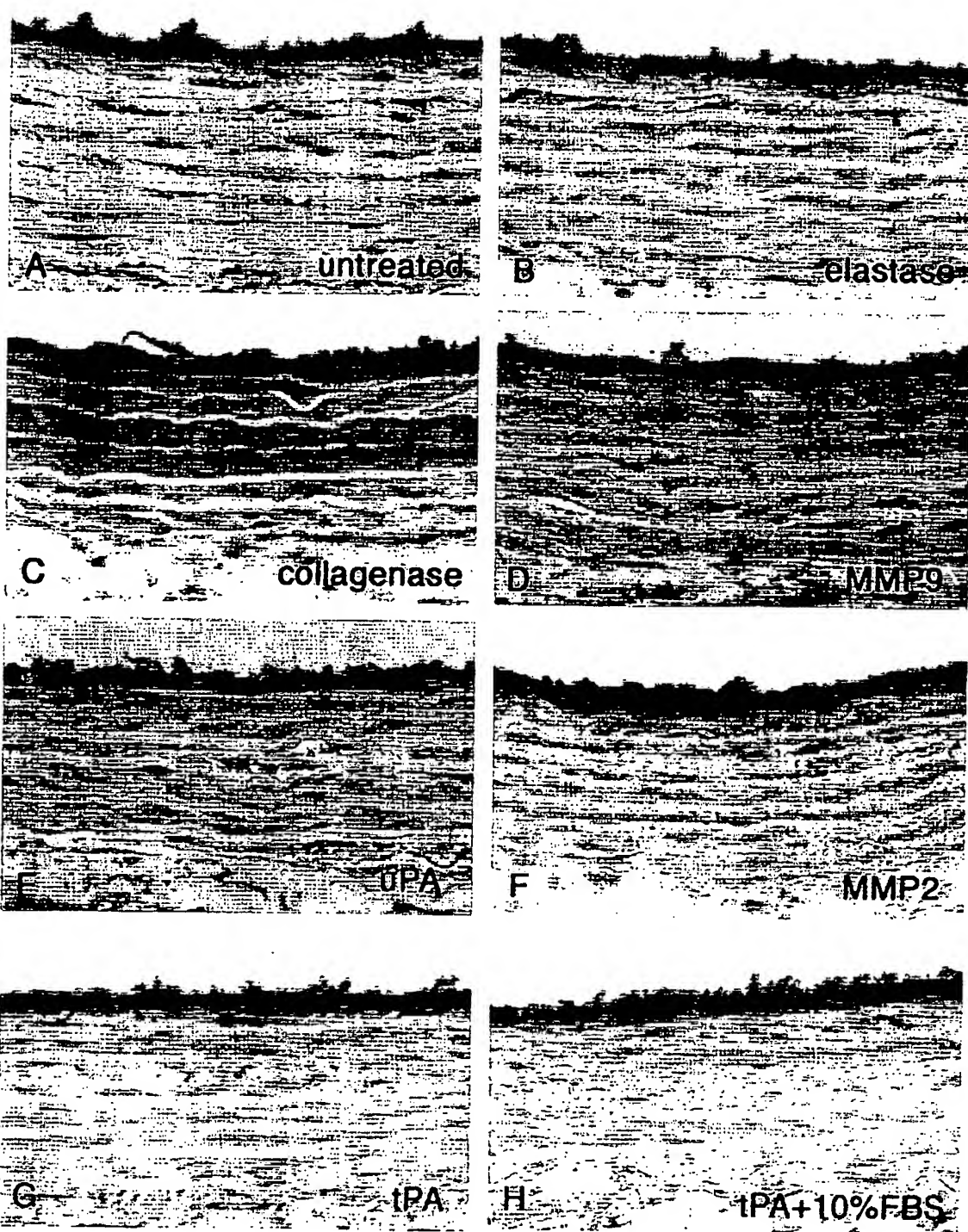
14/17

図 14

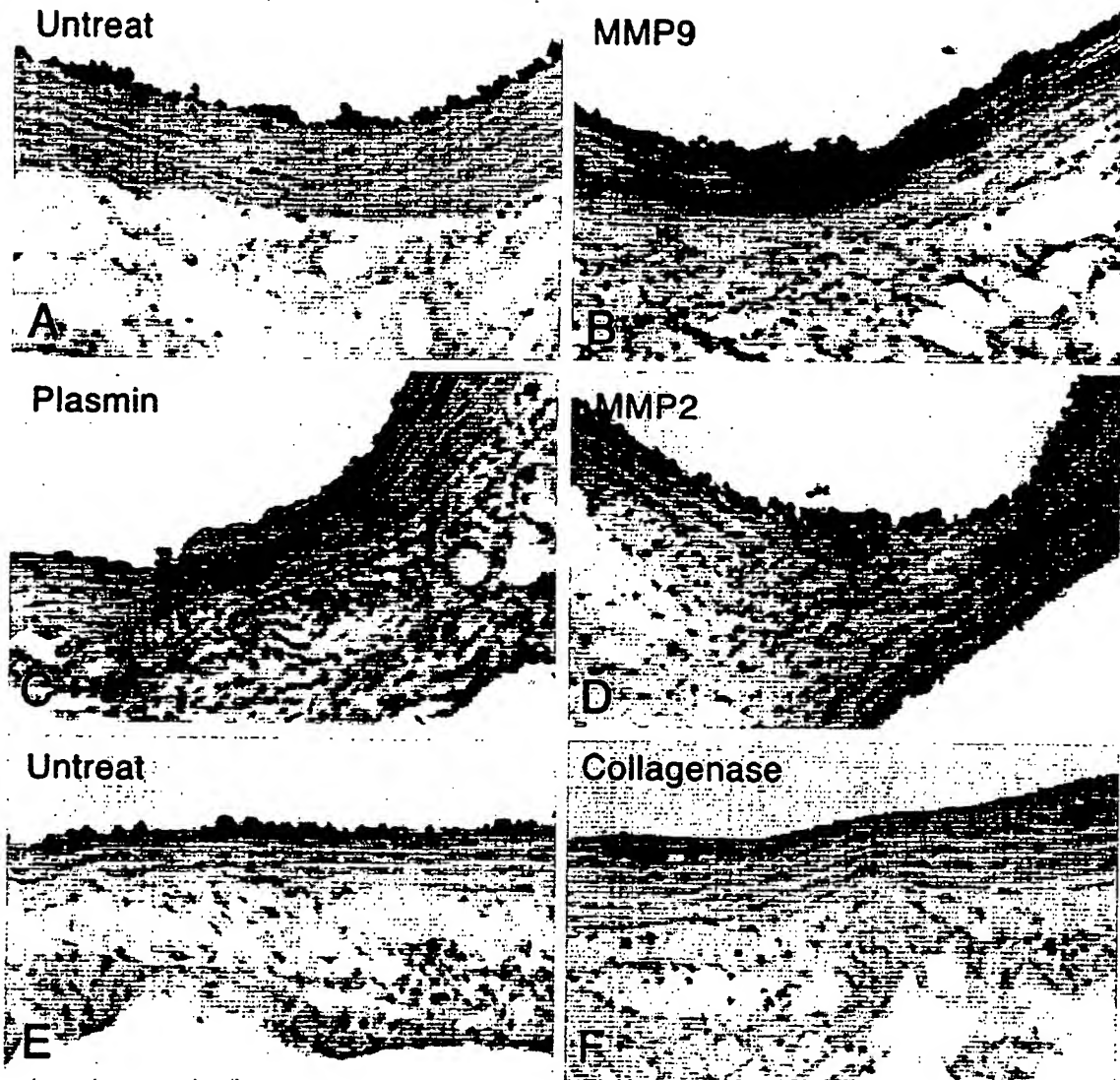


15/17

15

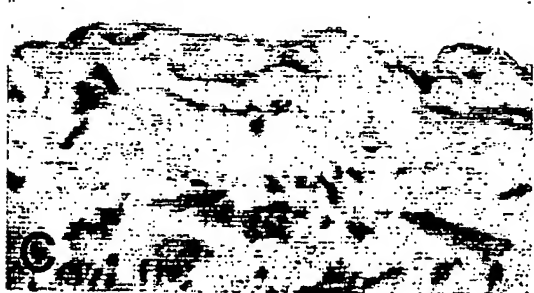
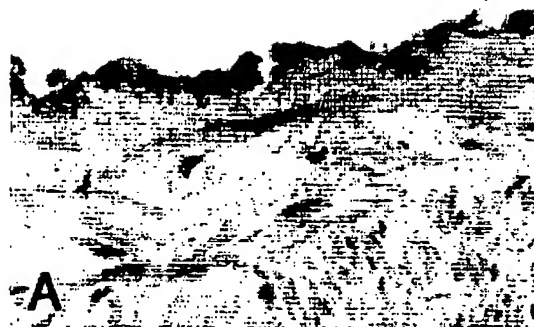


16



17/17

図 17



SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research Inc.

<120> Paramyxovirus vectors for gene transduction into vascular

<130> D3-106PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000-014136

<151> 2000-01-19

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Sequence

<400> 1

ctttcaccct

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Sequence

<400> 2

tttttcttac tacgg

15

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Sequence

<400> 3

cggccgcaga tcttcacg

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Sequence

<400> 4

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

gttgagtact gcaagagc

18

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tttgccggca tgcattgttc ccaaggggag agttttgcaa cc

42

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

tgggtgaatg agagaatcag c

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/45, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/45, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nabel, E. G. et al., "Recombinant Gene Expression in Vivo Within Endothelial Cells of the Arterial Wall" Science, Vol. 244 (1990), pp.1285-1288	1-13
Y	WO, 97/16538, A1 (DNAVEC RES INC), 09 May, 1997 (09.05.97) & JP, 9-517213, A & EP, 864645, A	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
23 April, 2001 (23.04.01)

Date of mailing of the international search report
22 May, 2001 (22.05.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl' C12N15/45, C12Q1/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl' C12N15/45, C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nabel, E. G. et al. "Recombinant Gene Expression in Vivo Within Endothelial Cells of the Arterial Wall" Science 第244巻 (1990) p. 1285-1288	1-13
Y	WO, 97/16538, A1 (DNAVEC RES INC) 9.5月. 1997 (09.05.97) & JP, 9-517213, A & EP, 864645, A	1-13
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 23.04.01	国際調査報告の発送日 22.05.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩	4B 9050
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

DESCRIPTION

USE OF PARAMYXOVIRUS VECTOR FOR GENE TRANSFER INTO BLOOD VESSEL

5 Technical Field

The present invention relates to a use of a Paramyxovirus vector for gene transfer into the blood vessel.

Background Art

10 Since the successful transfer of a recombinant gene into the vessel wall *in vivo* (Nabel E.G. et al., Science 244:1342-1344 (1989); Nabel E.G. et al., Science 249:1285-1288 (1990)), gene therapy has gained huge expectations as a technology for the treatment of human vascular diseases, and thereby, numbers of vector systems have been
15 developed and tested. Although the studies in animals were successful, there are several critical limitations on the vector systems including gene transfer efficiency, besides safety concerns. Thus, it is yet difficult to apply the results of those studies to clinical trials (DeYoung M.B. et al., Circ. Res. 82:306-313 (1998)).

20 For instance, in PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty), constriction is released by inflating a balloon at stenotic site. However, 30 to 40% of the balloon-treated vessels develop restenosis, which is a big clinical issue. The primary cause of restenosis is the growth of neointima and the reconstruction of
25 the blood vessel. Neointima, invaded by macrophages and enlarged by atherosclerosis, is mainly composed of the vascular smooth muscle cells migrating from tunica media, and the extracellular matrix. For gene therapies to block restenosis or to treat arteriosclerosis, it is effective to transfer genes into the artery; however, using the
30 existing vectors or liposomes, the transfer efficiency is low. Macrophages and vascular smooth muscle cells are the targets of treatment. Macrophages are located in intima under basal lamina, and vascular smooth muscle cells are located in vascular tunica media. Barriers of vascular endothelial cells and basal lamina exist in the
35 gene transfer into macrophages, and a barrier of elastic fibers in addition to the two exists in the gene transfer into smooth muscle

cells.

Recombinant adenovirus vector, one of the most widely used vectors for gene transfer into the blood vessel, is known for its relatively high transfection efficiency. However, several problems remain to be solved before application to patients. Although recombinant adenovirus vector is capable of transferring a foreign gene effectively into intact endothelial cells (ECs) and adventitia in animals (Rome J.J. et al., *Arterioscler. Thromb.* 14:148-161 (1994); Steg P.G. et al., *Circulation* 90:1648-1656 (1994)) and in humans as well (Rekhter M.D. et al., *Circ. Res.* 82:1243-1252 (1998)), the efficiency of adenovirus incorporation into the atherosclerotic region and medial layer is relatively low in rabbits (Feldman L.J. et al., *J. Clin. Invest.* 95:2662-2671 (1995)) and humans (Rekhter M.D. et al., *Circ. Res.* 82:1243-1252 (1998)). Thereby, the effectiveness of adenovirus is limited in gene therapies targeted at quiescent cells. In fact, administration of adenovirus from the interior of the blood vessel only leads to the restricted infection of endothelial cells, leaving macrophages and smooth muscle cells uninfected. Thus, it is yet difficult to infect a gene for treatment directly into the cells causing such diseases as atherosclerosis. More importantly, the gene transfer using adenovirus requires long exposure time to obtain maximal transfection efficiency (Feldman L.J. et al., *J. Clin. Invest.* 95:2662-2671 (1995)). This is thought to be because intracellular incorporation of vector particles through Coxsackie-adenovirus receptor (CAR) requires long-term contact. For instance, in PTCA, coronary arterial blood flow can be blocked at most for several minutes. Thus, it is a big obstacle for the clinical application of adenovirus vector.

To solve the above problems associated with use of adenovirus vector, several different approaches have been attempted. In the first method, the infectivity is improved by ablating the endothelial cell using the balloon catheter. In the second method, the endothelial cell is first ablated with the balloon catheter, and then infection is performed while pressure is applied. In the last method, after ablation of endothelial cells with the balloon catheter, the tissue surface is digested with elastase. None of the methods, however,

achieve sufficient infectivity; moreover, each of infection and pressure application takes about 30 minutes or more to be completed (Guzman R.J. et al., Circulation 88:2838-2848 (1993); Maillard L. et al., Gene Ther. 5:1023-1030 (1998); Rekhter M.D. et al., Circ. Res. 82:1243-1252 (1998); Rome J.J. et al., Hum. Gene Ther. 5:1249-1258 (1994); Weeks B.S. et al., Arch. Virol. 145:385-396 (2000)).

A liposome coated with the envelope protein of Sendai virus (SeV, or hemagglutinating virus of Japan; HVJ), so called HVJ-liposome is capable of transferring genes at relatively high efficiency. The present inventors already reported that *in vivo* injection of HVJ-liposome into rabbit carotid artery at 150 mmHg for 10 minutes resulted in transfection in the medial smooth muscle cell at efficiency of 80% or more (Yonemitsu Y. et al., Lab. Invest. 75:313-323 (1996)). Examination of the blood vessel by electron microscopy revealed that the vector particles penetrate to all over the medial layer, suggesting that the permeability of the blood vessel walls of middle-sized animals is relatively high. The present inventors applied the vector system to induce vascular disorders *in vivo* by overexpressing several genes including vascular endothelial cell growth factor (VEGF) and human cytomegarovirus immediate early gene (Yonemitsu Y. et al., Lab. Invest. 75:313-323 (1996); Yonemitsu Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 231:447-451 (1997)), and also to suppress angiogenic diseases *in vivo* using endothelial constitutive NO synthetase gene (Matsumoto T. et al., J. Vasc. Surg. 27:135-144 (1998)) or wild-type p53 gene (Yonemitsu Y. et al., Circ. Res. 82:147-156 (1998)). However, the results of preclinical tests and preliminary experiments using diseased human saphenous veins and coronary arteries done by the present inventors showed that the efficiency of gene transfer and expression level achieved by the vector system were insufficient as previously reported in adenovirus (Feldman L.J. et al., J. Clin. Invest. 95:2662-2671 (1995)). Specifically, transfection using HVJ-liposome into neointima and media is restricted in the only a few layers from the surface even at 1 atmospheric pressure, which suggests that the permeability of vector particles is lost. These results obtained by using adenovirus or HVJ-liposome indicate that there exist biological barriers in diseased human vessel walls. Therefore, the development

of a new vector system that can overcome such problems has been desired.

Disclosure of the Invention

5 An object of the present invention is to provide a virus vector that is capable of transferring genes into the vascular cells with short exposure and furthermore expressing thus transferred genes therein constitutively, and its use. More specifically, the present invention provides a Paramyxovirus vector for gene transfer into the vascular cells and a method of gene transfer into the vascular cells
10 using such vector.

The present inventors utilized reverse genetics technology of Sendai virus (abbreviated to "SeV"), and succeeded in the development of a recombinant SeV vector for gene transfer (Kato A. et al., Genes Cells 1:569-579 (1996); Kato A. et al., EMBO J. 16:578-587 (1997);
15 Yu D. et al., Genes Cells 2:457-466 (1997); Hasan M.K. et al., J. Gen. Virol. 78:2813-2820 (1997); Sakai Y. et al., FEBS Lett. 456:221-226 (1999); WO 97/16538 and WO 97/16539).

The present inventors characterized the gene transfer into the blood vessel using the recombinant SeV vector, and examined whether
20 the vector could overcome the problems shared by the existing gene transfer vectors. Specifically, the present inventors carried out (1) the evaluation of the transfection activity for SeV *in vitro*, including the transfection efficiency, gene expression efficiency, persistence of gene expression, and effect of vector exposure time, from clinical point of view; (2) the examination of the transfection
25 ability of SeV into human blood vessel and the cell types to be transfected, using diseased human great saphenous vein obtained surgically from patients having varix in the lower limb.

The results showed that recombinant SeV containing the firefly
30 luciferase gene achieved constitutive gene expression in a dose dependent manner in both proliferating and quiescent cells, suggesting that the genome was stable over one month. In addition, it was revealed that nearly maximal level of gene expression was obtained by short exposure in both cultured cells and human vein. The result of *ex vivo*
35 experiment using human diseased great saphenous vein and SeV encoding nuclear-targeted lacZ gene showed that the endothelial cells (EC)

in the lumen and vasa vasora (vessel wall nutrient vessel) and adventitial fibroblasts were transfected at high efficiency by both transfection into the lumen and simple floating method.

Thus, the present inventors found that (1) short exposure of
5 solution containing the Paramyxovirus vector to the blood vessel was sufficient to perform gene transfer efficiently, and (2) both virus genome and the expression of foreign gene were stable for a long time and were, at least *in vitro*, relatively stable for one month or more in both proliferating cells and quiescent cells at least *in vitro*.
10 These results obviously contrast with those obtained with adenovirus vector, which has been used as a promising standard in the field of gene transfer into the blood vessel. Adenovirus vector has been shown to have several advantages such as high expression level of transferred gene and high efficiency of gene transfer, both of which are independent
15 of cell cycle. These features are shared by the Paramyxovirus vector. Taking the features of the Paramyxovirus vector into account, it is possible to establish gene therapies targeted at the blood vessel for individual clinical applications.

When the infectivity of lacZ/Adenovirus vector and that of
20 lacZ-SeV were compared with each other in gene transfer into *in vitro* organ culture using rat thoracic artery, lacZ-SeV achieved high infectivity in vascular endothelial cells at lower moi with short exposure (2 minutes). Thus, it became clear that the Paramyxovirus vector of the present invention can overcome the temporal limitation
25 that is one of the big problems for infection with adenovirus vector.

The present inventors further found that digesting the extracellular matrix such as basal lamina and elastic fibers by treating with protease before administration of vector enabled transfection into media at high efficiency. Improved efficiency of transfection
30 into vascular media by protease treatment was observed when protease and vector of the present invention were mixed and then administered simultaneously, as well as when the vector was administered after protease treatment. In particular, the finding that simultaneous administration of premixed protease and vector achieved transfection
35 into the medial layer of blood vessel was unpredictable. Thus, the present inventors first demonstrated that it is possible to perform

protease treatment and vector infection simultaneously. Examination of the effect of pretreatment with various proteases on the infectivity of lacZ-SeV using rat thoracic artery that were organ cultured *in vitro* revealed that all the examined protease improved the infectivity of lacZ-SeV. In particular, pretreatment with collagenase, tPA, and MMP9 was markedly more effective than that with elastase, which has been shown to be effective in adenovirus vector infection. Examination of sections which were constructed to determine the regions containing cells infected by SeV vector revealed that pretreatment with collagenase, tPA, or MMP9 resulted in infection even into the smooth muscle cells of media beyond the vascular endothelial cells and basal lamina. *In vivo* gene transfer experiments using rat abdominal aorta revealed, as *in vitro* experiments, that pretreatment with collagenase, tPA, and MMP9 resulted in infection in media. In addition, the time required for performing a series of protease treatment and infection could be shortened to 7 to 9 minutes or shorter (for instance no more than 5 minutes). Thus, the vector of the present invention has enabled gene transfer into cells in media, which has been unreachable by conventional vectors, and thereby it solved not only temporal but also spatial limitations on gene transfer into blood vessels.

It has been reported that infectivity of adenovirus vector was improved by ablation of endothelial cells using the balloon catheter and/or digestion with elastase before vector administration (Maillard L. et al., Gene Ther. 5:1023-1030 (1998)). However, the infectivity was still low, especially in the smooth muscle cells. In contrast, the infectivity of the vector of the present invention is high, and the types of target cells are also expanded. Combining protease treatment with the Paramyxovirus vector of the invention which only requires short exposure to infect and, it is also possible to more efficiently transfer genes into macrophages and smooth muscle cells in the blood vessel.

Thus, the present invention relates to a Paramyxovirus vector that is used for gene transfer into the blood vessel, and a method for transferring a gene using such vector. More specifically, the present invention relates to:

(1) a method for transferring a nucleic acid into a vascular cell,

said method comprising a step of contacting a recombinant Paramyxovirus vector or a cell comprising said vector with said vascular cell;

(2) a method for transferring a nucleic acid into a vascular cell, said method comprising performing the following steps (a) and (b)

5 sequentially or simultaneously:

(a) treating a tissue comprising a vascular cell with a protease, and

(b) contacting a recombinant Paramyxovirus vector or a cell comprising said vector with said vascular cell;

10 (3) the method according to (2), wherein said protease is selected from the group consisting of collagenase, urokinase, elastase, tissue plasminogen activator, plasmin, and matrix metalloproteinases;

(4) the method according to any one of (1) to (3), wherein said nucleic acid contained in the recombinant Paramyxovirus vector comprises a
15 foreign gene;

(5) the method according to any one of (1) to (4), wherein said vascular cell is selected from the group consisting of an endothelial cell in a vascular lumen, an endothelial cell in a vasa vasorum (vessel wall nutrient vessel), a vascular smooth muscle cell in vascular media, and an adventitial cell;

20 (6) the method according to any one of (1) to (5), wherein said Paramyxovirus is Sendai virus;

(7) a recombinant Paramyxovirus vector that transfers a nucleic acid into a vascular cell;

25 (8) the vector according to (7), wherein said Paramyxovirus is Sendai virus;

(9) the vector according to (7) or (8), wherein said nucleic acid contained in the recombinant Paramyxovirus vector comprises a foreign gene;

30 (10) the vector according to any one of (7) to (9), wherein said vascular cell is selected from the group consisting of an endothelial cell in a vascular lumen, an endothelial cell in a vasa vasorum (vessel wall nutrient vessel), a vascular smooth muscle cell in vascular media, and an adventitial cell;

35 (11) a composition for gene transfer into a vascular cell, said composition comprising the recombinant Paramyxovirus vector according

to any one of (7) to (10);

(12) a kit for gene transfer into a vascular cell, said kit comprising the recombinant Paramyxovirus vector according to any one of (7) to (10) and a protease; and

- 5 (13) the kit according to (12), wherein said protease is selected from the group consisting of collagenase, urokinase, elastase, tissue plasminogen activator, plasmin, and matrix metalloproteinases.

Herein, a "Paramyxovirus vector" is defined as a vector (or carrier) that is derived from the Paramyxovirus and that is used for
10 gene transfer to host cells. The Paramyxovirus vector of the present invention may be RNP or a virus particle having infectivity. Here, "infectivity" is defined as the ability of the Paramyxovirus vector to transfer, through its cell adhesion and membrane fusion abilities, a gene contained in the vector to cells to which the vector is adhered.
15 In a preferred embodiment, the Paramyxovirus vector of the present invention carries a foreign gene in an expressible manner. The Paramyxovirus vector may have a replication ability, or may be a defective vector without the replication ability. Herein, "replication ability" is defined as the ability of virus vectors to
20 replicate and produce infective virus particles in host cells infected with the virus vectors.

Herein, a "recombinant" Paramyxovirus vector is defined as that constructed by gene engineering or its amplified products. For instance, recombinant Paramyxovirus vectors can be generated by
25 reconstitution of a recombinant Paramyxovirus cDNA.

Herein, a Paramyxovirus is defined as a virus of the *Paramyxoviridae* family or a derivative thereof. The present invention can be applied to, for example, Paramyxoviruses such as Sendai virus, Newcastle disease virus, Mumps virus, Measles virus, Respiratory
30 syncytial virus, rinderpest virus, distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), type I, II, and III human parainfluenza virus of the *Paramyxoviridae*. The virus of the present invention may be preferably a virus of the genus *Paramyxovirus* or a derivative thereof. Viruses of the genus *Paramyxovirus* to which the present invention
35 is applicable include type I parainfluenza viruses including Sendai virus and human HA2, type II parainfluenza viruses including simian

SV5 and SV41 and human CA, type III parainfluenza viruses including bovine SF and human HA1, type IV parainfluenza viruses including subtype A and subtype B, Mumps virus, Newcastle disease virus, and many other viruses of the genus *Paramyxovirus*. Most preferably, the
 5 *Paramyxovirus* of the invention may be the Sendai virus. These viruses may be wild-type strains, mutant strains, laboratory-passaged strains, artificially constructed strains, or so on. Incomplete viruses such as the DI particle (Willenbrink W. and Neubert W. J., J. Virol., 1994, 68, 8413-8417), synthesized oligonucleotides, and so on, may also
 10 be utilized as material for generating the virus vector of the present invention.

Genes encoding proteins of a *Paramyxovirus* include NP, P, M, F, HN, and L genes. Here, the "NP, P, M, F, HN, and L genes" represent those encoding the nucleocapsid protein, phosphoprotein, matrix
 15 protein, fusion protein, hemagglutinin-neuraminidase, and large protein, respectively. Genes of each virus of the subfamily *Paramyxovirus* are described generally as follows. In general, NP gene may also be indicated as "N gene".

	<i>Paramyxovirus</i>	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
20	<i>Rublavirus</i>	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
	<i>Morbillivirus</i>	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

For instance, the accession numbers in the nucleotide sequence database of each gene of the Sendai virus classified as a *Respirovirus* of *Paramyxoviridae*, are M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565,
 25 M69046, and X17218 for NP gene; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, and X17008 for P gene; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056 for M gene; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, and X02131 for F gene; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586,
 30 X02808, X56131 for HN gene; and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, and X58886 for L gene.

Here, a "gene" is defined as a genetic substance, which includes nucleic acids such as RNA and DNA. Genes may have naturally derived or artificially designed sequences. An artificially designed protein,
 35 for instance, may be a fusion protein with another protein, a dominant negative protein, including a soluble form of a receptor or a

membrane-bound dominant negative receptor, a deletion form of a cell adhesion molecule, and a soluble form of a cell surface molecule. Herein, "DNA" includes single stranded DNA or a double stranded DNA.

Herein, "vascular cells" are defined as cells composing the blood vessel, and include such cells as those in the endothelium (lumen), media, adventitia, and vasa vasora. These cells include endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, etc.

The present invention provides a use of a recombinant Paramyxovirus vector for gene transfer into the vascular cells. The present inventors have found that Sendai virus is capable of transferring genes into vascular cells with short exposure. In the experiments by the present inventors, significant gene expression was detected in vascular cells only 1 hr after the gene transfer, and the expression level increased logarithmically in a time dependent manner. Moreover, the vector of the present invention exhibited sufficient infectivity into vascular cells even with extremely short exposure (several minutes). This brings great advantage in gene transfer into the arterial lumen at the regions of PTCA, for instance, because use of a recombinant Paramyxovirus can minimize the time in which blood flow is blocked. *In vitro* studies by Guzman et al. showed that adenovirus vector containing lacZ can be transfected into only 25% of vascular smooth muscle cells (VSMC) with 5 min exposure, and 80% even with 120 min exposure (Guzman R.J. et al., Circulation 88:2838-2848 (1993)). Similar results were representatively observed in the experiments by the present inventors using BSMC (Figure 8). It suggests that this practical problem in application for PTCA can be solved by using a recombinant Paramyxovirus in gene transfer targeted at the endothelial cells.

In addition, the present inventors revealed that the genes transferred into vascular cells using a recombinant Sendai virus were persistently expressed at least over one month. This brings an advantage that continuous effect on treatment can be obtained when gene therapies targeted at vascular cells was performed using a recombinant Paramyxovirus vector.

Sendai virus vectors can be preferably utilized in clinical trials of human gene therapy in terms of safety as well. First, it is a major

obstacle in high efficient gene transfer that transfected DNA must be transported into the nucleus for the expression of a foreign gene. In the case of Sendai virus and such, however, expression of a foreign gene is driven by both cellular tubulin and its RNA polymerase (L protein) in the cytoplasm. This suggests that the Sendai virus does not interact with the genome of host cells, which avoids safety problems such as tumorigenesis. Second, the Sendai virus is known to be pathogenic in rodents causing pneumonia, but not in humans, which is supported by studies showing that the intranasal administration of the wild type Sendai virus does not do harm in nonhuman primates (Hurwitz J. L. et al., Vaccine, 1997, 15, 533-540). These features suggest that Sendai virus vector can be utilized in human therapy, and further, support the notion that Sendai virus can be one of the promising alternatives in gene therapy to vascular wall.

Thus, the finding that Paramyxovirus vector has various advantages in gene transfer into vascular cells may bring great advance in gene therapy, especially those targeted at vascular cells, where the finding was obtained by the present invention. Therefore, the present invention relates to a recombinant Paramyxovirus vector used for transferring nucleic acid into a vascular cell, and a method for transferring nucleic acid into a vascular cell using such vector. The present invention also provides a use of a recombinant Paramyxovirus vector for transferring nucleic acid into vascular cells.

The recombinant Paramyxovirus vector of the present invention used for gene transfer into vascular cells is not limited to any special kind. For instance, vectors that have the replication ability and that are capable of autonomous propagation may be preferably utilized. In general, the genome of the wild type Paramyxovirus contains a short 3' leader region followed by six genes encoding N (nucleocapsid), P (phospho), M (matrix), F (fusion), HN (hemagglutinin-neuraminidase), and L (large) proteins, and has a short 5' trailer region on the other terminus. The vector of the present invention that is able to replicate autonomously can be obtained by designing a genome having a similar structure to that described above. In addition, a vector for expressing a foreign gene can be obtained by inserting the foreign gene to the genome of the above vector. The Paramyxovirus vector of the invention

may have an altered alignment of virus genes, compared with wild type virus.

The Paramyxovirus vector of the invention may have deletion(s) of some of the genes that are contained in the wild type virus. For instance, in the case of the reconstitution of the Sendai virus vector, proteins encoded by NP, P/C, and L genes are thought to be required in trans, but the genes may not be a component of the virus vector. In one embodiment, an expression vector carrying genes encoding the proteins may be co-transfected into host cells with another expression vector encoding the vector genome to reconstitute a virus vector. Alternatively, an expression vector encoding the virus genome is transfected into host cells carrying genes encoding the proteins, and thus a virus vector can be reconstituted by using the proteins provided by the host cell. The amino acid sequence of these proteins may not be identical to those derived from the original virus as long as it has an equivalent or higher activity in nucleic acid transfer, and may be mutated or replaced with that of a homologous gene of another virus.

Proteins encoded by M, F, and HN genes are thought to be essential for cell-to-cell propagation of a Paramyxovirus vector. However, these proteins are not required when the vector is prepared as RNP. If genes M, F, and HN are components of the genome contained in RNP, products of these genes are produced when introduced into host cells, and virus particles having infectivity are generated. RNP vectors that produce an infective virus include a virus genome RNA encoding N, P, M, F, HN, and L genes and RNP containing N, P, and L proteins. When such RNP is introduced into cells, virus genome is expressed and replicated through functions of the proteins, and thus infective virus vectors are amplified.

RNP can be introduced into cells as a complex formed with lipofectamine, polycationic liposome, and the like. Specifically, a variety of transfection reagents can be used, for instance, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169). Chloroquine may be added to prevent degradation in the endosome (Calos M. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 3015). In the case of replicative viruses, the produced

viruses can be amplified or passaged by re-infecting into cultured cells, chicken eggs, or animals (e.g. mammalian such as mice).

Contrastingly, the Paramyxovirus vector of the present invention may be those lacking the M, F, and/or HN genes. These vectors can be reconstituted by providing deleted gene products exogenously. Such vectors can still adhere to host cells and induce cell fusion as the wild type. However, daughter virus particles do not have the same infectivity as the original ones because the vector genome introduced into cells lacks one of the above genes. Therefore, these vectors can be useful as safe virus vectors that are capable of only a single gene transfer. For instance, genes deleted from the genome may be F and/or HN genes. Virus vectors can be reconstituted by co-transfection of an expression plasmid encoding the genome of a recombinant Paramyxovirus lacking the F gene, an expression vector for the F protein, and that for NP, P/C, and L proteins into host cells (PCT/JP00/03194 and PCT/JP00/03195). Alternatively, host cells in which the F gene is integrated into the chromosome may be used. The amino acid sequence of these proteins provided exogenously may not be identical to those of the wild type and may be mutated or replaced by a homologous protein of another virus as long as they provide equivalent or higher gene transfer activity.

The envelope protein of the Paramyxovirus vector of the invention may contain another protein than the envelope protein of the original vector genome. There is no limitation on such proteins. These may include envelope proteins of other viruses such as the G protein of the vesicular stomatitis virus (VSV-G). Thus, the Paramyxovirus vector of the invention includes a pseudo type virus vector that has an envelope protein derived from a virus different from the original virus. F protein and/or HN protein originally contained in Paramyxovirus may be deleted.

Incomplete virus such as DI particles (J. Virol. 68:8413-8417 (1994)) or synthetic oligonucleotides may be used as a component of the vector of the present invention instead of complete Sendai virus genome.

Also, the vector of the invention may contain, on the surface of its envelope, adhesion molecules, ligands, receptors, or fragments

of these targeted at particular cells. For example, a chimeric protein having a polypeptide derived from adhesion molecules, ligands, or receptors targeted at particular cells in its extracellular domain and a polypeptide derived from the virus envelope protein in its intracellular domain can be used as an envelope. It enables the production of a vector targeting a particular tissue. These proteins may be encoded by the virus genome itself, or supplied at the time of virus reconstitution through expression of genes other than virus genome (for example, another expression vector or host cell chromosome).

The virus genes contained in the vector of the present invention may be altered, for example, to reduce antigenicity or enhance RNA transcription efficiency or replication efficiency. Specifically, it is possible to alter at least one of the NP, P/C, and L genes, which are genes of replication factors, to enhance transcription or replication. It is also possible to alter the HN protein, a structural protein having hemagglutinin activity and neuraminidase activity, to enhance the virus stability in blood by weakening the former activity and to regulate infectivity by altering the latter activity. It is also possible to alter the F protein, which is implicated in membrane fusion, to regulate the fusion ability of membrane-fused liposomes. Furthermore, it is possible to generate a virus vector that is engineered to have weak antigenicity through analyzing the antigen presenting epitopes and such of possible antigenic molecules on the cell surface such as the F protein and HN protein.

The virus vector of the present invention may contain a foreign gene in the genome RNA. A recombinant Paramyxovirus vector containing a foreign gene can be obtained by inserting the gene into the genome of the above-described Paramyxovirus vector. The foreign gene may be a gene encoding a protein to be expressed in target vascular cells but is not limited thereto. It may encode a natural protein, or an altered protein having a deletion, substitution, or insertion as long as the protein has a function equivalent to that of the natural protein. Alternatively, it may be an artificially designed protein such as a dominant negative mutant. Also, it may be a nucleic acid that does not encode a protein, such as antisense or ribozyme.

For instance, for the purpose of gene therapy and such, a gene used to treat a target disease may be inserted into the DNA encoding the genome of the virus vector (the virus vector DNA). In the case of inserting a foreign gene into Sendai virus vector DNA, a sequence comprising nucleotides of multiples of six is desirably inserted between the transcription end sequence (E) and the transcription start sequence (S) (Calain P. and Roux L., J. Virol., 1993, 67(8), 4822-4830). A foreign gene can be inserted upstream and/or downstream of each of the virus genes (NP, P, M, F, HN, and L genes). In order not to interfere with the expression of upstream and downstream genes, an E-I-S sequence (transcription end sequence-intervening sequence-transcription start sequence) or a portion of it may be suitably placed upstream or downstream of a foreign gene so that E-I-S sequence is located between each gene.

Expression level of inserted foreign genes can be regulated by the type of transcription start sequence that is attached to the upstream of the genes (PCT/JP00/06051). It also can be regulated by the position of insertion and the sequence surrounding the gene. In the Sendai virus, for instance, the closer to the 3'-terminus of the negative strand RNA of the virus genome (the closer to NP gene in the gene arrangement on the wild type virus genome) the insertion position is, the higher the expression level of the inserted gene will be. To achieve a high expression of a foreign gene, it is preferably inserted into the upstream region of the negative stranded genome such as the upstream of the NP gene (3' flanking sequence on the minus strand), or between NP and P genes. Conversely, the closer to the 5'-terminus of the negative strand RNA (the closer to L gene in the gene arrangement on the wild type virus genome) the insertion position is, the lower the expression level of the inserted gene will be. To reduce the expression of a foreign gene, it may be inserted into the most 5' position on the negative strand, that is, downstream of the L gene in the wild type virus genome (5' flanking region of the L gene on the negative strand) or upstream of the L gene (3' flanking region of L gene on the negative strand) (Japanese Patent Application No. 2000-152726). Thus, the insertion position of a foreign gene can be properly adjusted so as to obtain a desired expression level of the

gene or optimize the combination of the insert with the virus genes surrounding it. For instance, if the overexpression of a gene introduced by a high titer virus vector may cause toxicity, it is possible not only to control the virus titer, but also to reduce the expression level of individual vectors by designing the insertion position closer to the 5'-terminus of the negative strand, or replacing the transcription start sequence with one having lower efficiency so as to obtain an appropriate therapeutic effect.

To help the easy insertion of a foreign gene, a cloning site may be designed at the position of insertion. For example, the cloning site may be the recognition sequence of restriction enzymes. The restriction sites in the virus vector DNA can be used to insert a foreign gene. The cloning site may be a multicloning site that contains recognition sequences for multiple restriction enzymes. The vector of the present invention may have other foreign genes at positions other than that used for above insertion.

Construction of a recombinant Sendai virus vector having a foreign gene can be performed as follows, for example, according to the method described (Kato A. et al., EMBO J., 1997, 16, 578-587; Yu D. et al., Genes Cells, 1997, 2, 457-466).

First, a DNA sample containing a cDNA sequence encoding a desired foreign gene is prepared. It is preferable that the concentration of the sample is 25 ng/ μ l or higher and that it can be detected as a single plasmid by electrophoresis. The following description is an example where a foreign gene is inserted into the NotI site of virus genome DNA. If the cDNA sequence contains a NotI site, the site is desirably removed in advance by altering the nucleotide sequence using site-directed mutagenesis and such while maintaining the encoded amino acid sequence. A desired DNA fragment is amplified by PCR from the DNA sample. In order to obtain a fragment having NotI sites at both ends and to add a single copy of the transcription end sequence (E), intervening sequence (I), and transcription start sequence (S) of the Sendai virus (EIS sequence) to one end, a synthesized DNA primer pair, namely, a pair of a forward primer (sense strand) comprising a part of the desired gene, and a reverse primer (antisense) comprising a NotI recognition site, E, I, and S sequences, and part of the desired

gene, is prepared.

For example, the forward synthetic DNA sequence contains two or more nucleotides at the 5'-terminus to insure digestion with NotI (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the NotI recognition site, such as GCG and GCC; more preferably ACTT). To the 3'-terminus of the sequence, the NotI recognition sequence GCGGCCGC is added. Furthermore, to the 3'-terminus, as a spacer, any 9 nucleotides or those of 9 plus multiples of 6 are added. Furthermore, to the 3'-terminus, a sequence of approximately 25 nucleotides corresponding to the ORF of the desired cDNA starting from the initiation codon ATG is added. The 3'-terminus of the forward synthetic oligo DNA containing approximately 25 nucleotides of the desired cDNA is preferably selected so that the last nucleotide is G or C.

The reverse synthetic DNA sequence contains two or more nucleotides at the 5'-terminus (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the NotI recognition site, such as GCG and GCC; more preferably ACTT). To the 3'-terminus of the sequence, the NotI recognition sequence GCGGCCGC is added. Furthermore, to the 3'-terminus, a spacer oligo DNA is added to adjust the length of the primer. The length of the oligo DNA is designed so that it is a multiple of 6 nucleotides including the NotI recognition sequence GCGGCCGC, the sequence complementary to the cDNA, and the EIS sequence derived from the Sendai virus genome as described below (so-called "rule of six"; Kolakofski D. et al., J. Virol., 1998, 72, 891-899; Calain P. and Roux L., J. Virol., 1993, 67, 4822-4830). Furthermore, to the 3'-terminus of the added sequence, complementary sequences to the S sequence of the Sendai virus, preferably 5'-CTTTCACCCT-3' (SEQ ID NO: 1), to the I sequence, preferably 5'-AAG-3', and to the E sequence, preferably 5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (SEQ ID NO: 2) are added. Finally, to the 3'-terminus, a sequence, which is selected so that the last nucleotide of the complementary sequence of the desired cDNA becomes G or C, is added, where the last nucleotide is approximately 25 nucleotides upstream from the termination codon. Thus, the 3'-terminus of the reverse synthetic oligo DNA is prepared.

PCR can be performed by a common method using, for example, ExTaq polymerase (TaKaRa). Vent polymerase (NEB) may be used preferably,

and the amplified fragment is digested with NotI, and inserted into the NotI site of the plasmid vector pBluescript. The nucleotide sequence of the obtained PCR product is checked with an automated DNA sequencer, and a plasmid having the correct sequence is selected.

5 The insert is excised from the plasmid by NotI digestion, and subcloned into the NotI site of the plasmid (for example, pSeV18⁺b(+)) (Yu, D. et al., Genes to Cells 2: 457-466, 1997) or pSeV(+) (Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-587, 1997)) containing the genomic cDNA to obtain recombinant Sendai virus cDNA into which the foreign cDNA is inserted.
10 Alternatively, the PCR products may be directly cloned into the NotI site of the latter plasmid to obtain recombinant Sendai virus cDNA.

For example, recombinant Sendai virus genomic cDNA can be constructed according to the methods in the literature (Kato A. et al., EMBO J., 1997, 16, 578-598; Hasan M. K. et al., J. Gen. Virol., 15 1997, 78, 2813-2820). Specifically, a spacer sequence of 18 bp containing the NotI site (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3'; SEQ ID NO: 3) is inserted into an adjacent gene locus of a cloned Sendai virus genomic cDNA (pSeV(+)) between the leader sequence and the 5'-terminus of a sequence encoding the N protein, and the plasmid pSeV18⁺b(+) 20 containing a self-cleavable ribozyme site derived from the antigenomic strand of the hepatitis delta virus is obtained (Hasan M. K. et al., J. General Virol., 1997, 78, 2813-2820). A foreign gene fragment is inserted into the NotI site of pSeV18⁺b(+) to obtain a recombinant Sendai virus cDNA into which a desired foreign gene has been inserted.

25 Thus constructed recombinant Paramyxovirus vector DNA is transcribed *in vitro* or in cells, and RNP is reconstituted in the presence of L, P, and NP proteins to generate a virus vector comprising the RNP. The present invention provides a method for producing the Paramyxovirus vector of the invention, the method comprising
30 transcribing a DNA encoding the genome of the virus. It also provides a DNA for producing the Paramyxovirus vector of the invention, the DNA comprising the DNA encoding the genome of the virus. The present invention relates to use of DNA encoding the genome of the vector to produce the Paramyxovirus vector of the invention. Reconstitution
35 of a virus from virus vector DNA can be performed according to the known methods (WO97/16539; WO97/16538; Durbin A. P. et al., Virol.,

1997, 235, 323-332; Whelan S. P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 8388-8392; Schnell M. J. et al., EMBO J., 1994, 13, 4195-4203; Radecke F. et al., EMBO J., 1995, 14, 5773-5784; Lawson N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 4477-4481; Garcin D. et al.,

5 EMBO J., 1995, 14, 6087-6094; Kato A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579; Baron M. D. and Barrett T., J. Virol., 1997, 71, 1265-1271; Bridgen A. and Elliott R. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 15400-15404). These methods enable the reconstitution of
10 Paramyxovirus vectors including the parainfluenza virus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, measles virus, rinderpest virus, and Sendai virus vectors from DNA. If the F, HN, and/or M genes are deleted from the virus vector DNA, infective virus particles will not be formed. However, it is possible to generate infective virus particles by introducing these deleted genes and/or genes encoding an envelope
15 protein from another virus into the host cells and expressing them.

Methods for introducing vector DNA into cells may include (1) forming DNA precipitates that can be incorporated into desired cells, (2) making a positively charged complex comprising DNA, a complex that is suitable for incorporation by the desired cells and that has
20 low cytotoxicity, and (3) instantaneously opening a pore large enough for DNA to pass through in the desired plasma membrane using an electrical pulse.

A variety of transfection reagents can be used in (2); for instance, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, and
25 DOSPER (Boehringer #1811169). For (1), transfection using calcium phosphate can be used. In this method, DNA incorporated by cells is taken up into phagocytic vesicles, but it is known that a sufficient amount of DNA is also taken up into the nucleus (Graham F. L. and van Der Eb J., Virol., 1973, 52, 456; Wigler M. and Silverstein S.,
30 Cell, 1977, 11, 223). Chen and Okayama studied the optimization of the transfer technology and reported (1) that maximal efficiency is obtained when cells and precipitates are incubated under 2 to 4% CO₂ at 35°C for 15 to 24 hr, (2) that circular DNA has higher activity than linear DNA, and (3) that the optimal precipitates are formed
35 when the DNA concentration in the mixed solution is 20 to 30 µg/ml (Chen C. and Okayama H., Mol. Cell. Biol., 1987, 7, 2745). The method

of (2) is suitable for transient transfection. More classically, a transfection method in which DEAE-dextran (Sigma #D-9885 M. W. 5×10^5) is mixed with DNA at a desired concentration ratio is known. Because most complexes are degraded in the endosome, chloroquine may be added to enhance the transfection efficiency (Calos M. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 3015). The method of (3), called electroporation, may be more broadly applied than the methods of (1) and (2) because it can be used for any kind of cells. The transfection efficiency can be maximized by optimizing the duration of pulse currents, the form of pulse, the strength of the electrical field (gap between electrodes, and voltage), conductivity of buffer, DNA concentration, and cell density.

Among the above three methods, the method of (2) is suitable for the present invention because it is easy to perform and enables the testing of a large number of samples using a large amount of cells. Preferably, transfection reagents such as the Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, #301305) or the DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim #1811169) are used.

Specific procedures of the reconstitution from cDNA are as follows.

LLC-MK2, a cell line derived from the monkey kidney, is cultured in a 24-well to 6-well plastic plate or in a 100-mm petri dish in minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and an antibiotic (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin) to be 70 to 80% confluent. Cells are then infected, for instance, at 2 pfu/cell with recombinant vaccinia virus vTF7-3 that expresses T7 polymerase, which has been inactivated by a 20-minute UV exposure in the presence of 1 µg/ml psoralen (Fuerst T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 8122-8126; Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579). The amount of psoralen and the duration of UV exposure can be optimized. One hour after infection, cells are transfected by, for example, lipofection using Superfect (QIAGEN) with 2 to 60 µg of, or more preferably 3 to 5 µg of the above recombinant Sendai virus cDNA together with expression plasmids for virus proteins (24-0.5 µg pGEM-N, 12-0.25 µg pGEM-P, and 24-0.5 µg pGEM-L, or more preferably 1 µg pGEM-N, 0.5 µg pGEM-P, and 1 µg pGEM-L) (Kato. A. et

al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579) that function in trans and are required for producing a full length Sendai virus genome. The transfected cells are cultured in serum free MEM containing, if desired, 100 µg/ml rifampicin (Sigma) and cytosine arabinoside (AraC) (Sigma) whose concentration is more preferably 40 µg/ml, so that the drug concentration is adjusted to be optimal to minimize the cytotoxicity of the vaccinia virus and maximize the recovery of virus (Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579). Cells are cultured for 48 to 72 hr after transfection, then collected and lysed through three cycles of freeze-thawing. The cell lysates are transfected into LLC-MK2 cells, and after a 3- to 7-day culture, the culture medium is collected. To reconstitute a virus vector lacking a gene encoding an envelope protein that is incapable of replication, the vector may be transfected into LLC-MK2 cells expressing an envelope protein, or co-transfected with expression plasmid for the envelope protein. Alternatively, transfected cells can be overlaid and cultured on LLC-MK2 cells expressing envelope protein to propagate a deletion virus vector (PCT/JP00/03194 and PCT/JP00/03195). Alternatively, the above cell lysates prepared by freeze-thawing can be inoculated into the chorioallantoic membrane of an embryonated chicken egg of ten days to collect the allantoic solution after about three days. The virus titer of the culture medium or the allantoic solution can be determined by measuring hemagglutinin activity (HA). The HA may be determined by "endo-point dilution" (Kato. A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579; Yonemitsu Y. and Kaneda Y., Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells., Molecular Biology of Vascular Diseases. Methods in Molecular Medicine, Ed. by Baker A. H., Humana Press, 1999, 295-306). To eliminate the possible contamination of vaccinia virus vTF7-3, the obtained allantoic sample may be diluted appropriately (10^6 times for instance) and re-amplified in chicken eggs. Re-amplification may be repeated, for example, three times or more. The obtained virus stock can be stored at -80°C . The titer of recovered Sendai virus is usually between 10^8 to 10^9 pfu/ml, and that of contaminating vaccinia virus vTF7-3 is usually not more than 10^3 to 10^4 pfu/ml.

Host cells are not limited to any special types of cells as long

as the virus vector can be reconstituted in the cells. Host cells may include LLC-MK2 cells, CV-1 cells derived from the monkey kidney, cultured cell lines such as BHK cells derived from hamster kidney, and human-derived cells. To obtain a large quantity of the Sendai virus vector, embryonated chicken eggs may be infected with virus vectors obtained from the above host cells and the vectors can be amplified. The method of producing virus vectors using chicken eggs has been established (Advanced protocols in neuroscience study III, Molecular physiology in neuroscience., Ed. by Nakanishi et al., Kouseisha, Osaka, 1993, 153-172). Specifically, for example, fertilized eggs are incubated for 9 to 12 days at 37 to 38°C in an incubator to grow the embryos. Virus vectors are inoculated into the chorioallantoic cavity, and eggs are further incubated for several days to propagate the vectors. Conditions such as the duration of incubation may vary depending on the type of recombinant Sendai virus used. Then, the allantoic solution containing viruses is recovered. Sendai virus vector is separated and purified from the allantoic sample according to the standard method (Tashiro M., Protocols in virus experiments., Ed. by Nagai and Ishihama, MEDICAL VIEW, 1995, 68-73).

For instance, a Sendai virus vector lacking the F protein can be constructed and prepared as follows (PCT/JP00/03194 and PCT/JP00/03195).

(1) Construction of Sendai virus genome cDNA lacking the F gene and an expression plasmid for F gene

Full length Sendai virus (SeV) genomic cDNA, pSeV18⁺b(+) (Hasan M. K. et al., J. General Virol., 1997, 78, 2813-2820) (pSeV18⁺b(+) may be also called pSeV18⁺), is digested with SphI and KpnI, and the resulting fragment (14673 bp) is recovered and cloned into pUC18 to obtain pUC18/KS. pUC18/KS is used for constructing a region lacking the F gene. Deletion of the F gene is performed by combination of PCR-ligation, and the ORF of the F gene (1698 bp, from ATG to TGA) is replaced with the sequence 5'-atgcatgccggcagatga (SEQ ID NO: 4) in the resulting F gene-deleted SeV genomic cDNA (pSeV18⁺/ΔF). PCR products obtained using primers (forward: 5'-gttgagtactgcaagagc/SEQ ID NO: 5; reverse:

5'-tttgccggcatgcatgtttcccaaggggagagttttgcaacc/SEQ ID NO: 6) and those with primers (forward: 5'-atgcatgccggcagatga/SEQ ID NO: 7; reverse: 5'-tgggtgaatgagagaatcagc/SEQ ID NO: 8) are digested with EcoT22I and cloned into the upstream and downstream of the F gene, respectively. The resulting plasmid is digested with SacI and SalI, and the fragment containing the F gene deletion site (4931 bp) is recovered and cloned into pUC18 to obtain pUC18/dFSS. pUC18/dFSS is digested with DraIII, and the fragment recovered is replaced with the DraIII fragment of pSeV18⁺ that contains F gene, and ligated to obtain pSeV18⁺/ΔF.

A foreign gene can be inserted into the NsiI or NgoMIV site in the F gene deletion site of pUC18/dFSS. For this purpose, a fragment containing a foreign gene may be amplified using NsiI-tailed primers or NgoMIV-tailed primers.

(2) Preparation of helper cells for inducible expression of SeV-F protein

A Cre/loxP inducible expression plasmid for the Sendai virus F gene (SeV-F) is constructed as follows. SeV-F gene is amplified by PCR, and cloned into the unique SwaI site of the pCALNdLw plasmid (Arai et al., J. Virol., 1998, 72, 1115-1121), which is designed for inducible expression of gene products through the function of Cre DNA recombinase, to obtain pCALNdLw/F.

To recover infective virus particles from the F gene-deleted genome, a helper cell line expressing SeV-F protein is established. LLC-MK2 cells, derived from the Simian kidney and commonly used for SeV propagation, may be used. LLC-MK2 cells are cultured at 37°C, 5% CO₂ in MEM containing 10% heat-inactivated and immobilized fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml of penicillin G sodium, and 50 µg/ml streptomycin. Because of the cytotoxicity of the SeV-F gene product, the gene is cloned into the pCALNdLw, where the expression of a cloned gene is inducible by Cre DNA recombinase. The above pCALNdLw/F is used for transfecting LLC-MK2 cells by the calcium phosphate method (mammalian transfection kit (Stratagene)) according to the standard protocol.

LLC-MK2 cells grown in 10-cm plates to be 40% confluent are

transfected with 10 µg pCALNdLw/F and incubated in 10 ml of MEM containing 10 % FBS at 37°C under 5% CO₂ for 24 hr. Then, cells are dispersed, resuspended in 10 ml of culture medium, and plated onto five 10-cm dishes, where 5 ml of cell suspension is plated onto one dish, 2 ml onto two, and 0.2 ml onto two. Cells are cultured in 10 ml of MEM containing 10% FBS plus 1200 µg/ml G418 (GIBCO-BRL) for 14 days with medium changed every two days, and stable transfectants are selected. Cells grown in the medium that are resistant to G418 are recovered using cloning rings. Cells of each clone are further cultured until they grow to be 100% confluent in a 10-cm dish.

To induce F protein expression, cells are grown to be 100% confluent in 6 cm dishes, and infected with AxCANCre adenovirus at moi = 3 according to the method by Saito et al. (Saito et al., Nucleic Acids Res., 1995, 23, 3816-3821; Arai T. et al., J. Virol., 1998, 72, 1115-1121).

(3) Reconstitution and propagation of the F gene-deleted SeV virus

The pSeV18⁺/ΔF into which a foreign gene has been inserted is transfected into LLC-MK2 cells as follows. Cells are plated at 5 x 10⁶ cells/dish onto 100-mm petri dishes, cultured for 24 hr, and then infected at room temperature for 1 hr with the recombinant vaccinia virus that expresses T7 RNA polymerase and that has been treated with psoralen and long UV (365 nm) for 20 min (Fuerst T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 8122-8126) (moi = 2) (moi = 2 to 3; preferably moi = 2). UV exposure may be performed using UV Stratainker 2400 equipped with five 15-watt bulbs (catalogue number 400676 (100 V), Stratagene, La Jolla, CA, USA). After cells are washed three times, plasmids pSeV18⁺/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L (Kato A. et al., Genes Cells, 1996, 1, 569-579) are resuspended with OptiMEM (GIBCO) at a ratio of 12 µg/dish, 4 µg/dish, 2 µg/dish, and 4 µg/dish, respectively and mixed with SuperFect transfection reagent (5 µl SuperFect (QIAGEN) for 1 µg DNA). The mixture is incubated for 10 min at room temperature, then resuspended with 3 ml of OptiMEM with a final concentration of 3% FBS, and added to the cells. After a 3-hr culture in an incubator, cells are washed twice with serum free MEM, and further cultured in MEM containing 40 µg/ml of cytosine

β -D-arabinofuranoside (AraC, Sigma) and 7.5 μ g/ml of trypsin (GIBCO) for 70 hr. Then, cells are collected and resuspended in OptiMEM at 10^7 cells/ml. Cells are frozen-thawed three times, then mixed with lipofection reagent DOSPER (Boehringer mannheim) (10^6 cells per 25 μ l DOSPER), incubated at room temperature for 15 min, and transfected into LLC-MK2/F7 cells (10^6 cells/well in 12-well-plate), which is one of the clones of F gene-expressing helper cells selected as described above. Cells are cultured in serum free MEM containing 40 μ g/ml of AraC and 7.5 μ g/ml of trypsin, and the culture supernatant is collected.

In preparing deletion virus vectors, two different virus vectors having deletion of a different envelope gene may be transfected into the same cell. In this case, each deleted envelope protein is supplied through expression from the other complex, and this mutual complementation permits the generation of infective virus particles, which can replicate and propagate. Thus, two or more of the virus vectors of the present invention may be simultaneously inoculated in a combination that complement each other, thereby producing a mixture of each envelope deletion virus vector at a low cost and in a large scale. Because these viruses lacking an envelope gene have a smaller genome, they can allow the insertion of a long foreign gene. In addition, it is difficult for these viruses, which are intrinsically non-infective, to keep the status of co-infection after being diluted outside cells, and thus they are sterilized and less harmful to the environment.

If a vector is prepared using as the foreign gene a therapeutic gene for a specific disease, gene therapy can be done by administering this vector. The virus vector of the present invention enables the expression of a foreign gene that can help cure a disease, an endogenous gene that is lacking or insufficient in patients, and such.

The virus vector of the present invention can be made as a composition together with a desired, pharmaceutically acceptable carrier. Herein, a "pharmaceutically acceptable carrier" is defined as those materials that can be administered with a vector, but does not inhibit gene transfer by the vector. For instance, the virus vector may be appropriately diluted with saline, phosphate buffered saline (PBS), and so on to make a composition. If the virus vector is propagated

in chicken eggs, the composition may contain an allantoic solution. The allantoic solution can be appropriately diluted with saline, phosphate buffered saline (PBS), etc. Also, the composition may contain carriers such as deionized water or a 5% dextrose aqueous solution. It may further contain stabilizers, antibiotics, or the like. The composition of the present invention comprises a pharmaceutical composition. Thus, the present invention also relates to the use of the virus vector or the above composition as a pharmaceutical.

The above-obtained recombinant Paramyxovirus vector, or a composition comprising said vector contacts with blood vessels to transfect a foreign gene harbored within the vector into vascular cells. Infectious Paramyxovirus vector is capable of transferring nucleic acid into cells with short exposure of the vector to blood vessels. Although there is no limitation on the vascular cells that are targeted by the gene transfer using Paramyxovirus vector, preferable examples of them include endothelial cells in the lumen, endothelial cells in vasa vasorum (vessel wall nutrient vessel), vascular smooth muscle cells in vascular media, and/or adventitial cells.

Specifically, the vector of the invention may be used for therapies targeted at the vascular cells in the following disorders and injuries:

- (1) restenosis after PTCA,
- (2) late occlusion after bypass surgery using autografted vein,
- (3) vasospasm,
- (4) transfer of genes encoding such as thrombolytic protein, or anticoagulant protein (e.g. tissue plasminogen activator, tissue factor pathway inhibitor (TFPI), etc.) for the treatment of thrombosis,
- (5) transfer of genes encoding angiogenic factors for the treatment of ischemic disease (e.g. ischemic arteriosclerosis, stenocardia, etc.).

Foreign genes that are particularly useful in gene transfer targeted at vascular cells (e.g. in gene therapies) may include those encoding:

- (1) cell cycle inhibitor (e.g. p53, p21, p16 and p27),

- (2) inhibitor of cell proliferation signal (e.g. mutant H-Ras),
- (3) secretory cell proliferation inhibitor (e.g. eNOS and CNP (C type sodium diuretic peptide)),
- (4) vascular smooth muscle relaxing factor (e.g. eNOS and CNP),
- 5 (5) vascular smooth muscle relaxing ion channel (e.g. C-terminal deletion mutant of Kir 6.2 potassium ion channel),
- (6) thrombolytic protein (e.g. tissue plasminogen activator and urokinase),
- (7) tissue factor pathway inhibitor (e.g. TFPI), and
- 10 (8) angiogenic factor (e.g. VEGF, FGF, and HGF).

For gene therapy, a composition containing the Paramyxovirus vector may be administered *in vivo* from the interior or exterior of the lumen into diseased vessels, and foreign genes are to be expressed in vascular cells. Alternatively, administration may be performed *ex vivo*. *In vivo* gene transfer may be performed by, for example, simple floating method into the vascular lumen, injection into the luminal space with positive pressure, or local administration such as drops into blood vessels. Alternatively, gene transfer may be performed by transferring a gene into the vascular lumen while blocking blood flow using the double balloon catheter, injecting forcefully using the infusion balloon catheter into the vascular smooth muscle layer, or pressing a vector to the vascular lumen using the hydrogel balloon catheter.

The vector of the present invention can efficiently transfer genes into the medial layers when administered with protease. Preferable examples of proteases to be used include those which digest the extracellular matrix of the blood vessel (such as those in the endothelium and media). Such protease may include matrix metalloproteases (MMPs), which include approximately 20 members identified in humans (Seiki M. APMIS 107:137-143 (1999)), 4 types of amphibian collagenase (Stolow M.A. et al., Mol. Biol. Cell 7:1471-1483 (1996)), sea urchin hatching enzyme (Nomura K. et al., Biochemistry 36(23):7225-7238 (1997)), and *Clostridium histolyticum* collagenase (Yoshida E. and Noda H. Biochim. Biophys. Acta 105(3):562-574 (1965)); elastase; plasmin; tissue plasminogen activator (tPA); urokinase; cathepsin (B, L, D, and G); trypsin; and

thrombin, but is not limited thereto. Among them, preferred proteases to be used in administration of the vector of the present invention are collagenase, urokinase, tPA, elastase, plasmin, and MMPs. More preferably, collagenase, plasmin, and MMPs may be used. Collagenase may be type 4 collagenase (e.g. *Clostridium histolyticum* collagenase), and MMPs may be MMP2 or MMP9. MMPs may be activated by treatment with aminophenylmercuric acetate (APMA). MMP2 or plasmin may be preferred for transferring vector from the interior of the blood vessel having enlarged intimal layers containing fibrin under basal lamina. A protease may be used alone or in combination with other proteases.

Nucleic acid transfer into the vascular cells using protease and the vector of the invention may be performed by a method comprising (a) treating tissues containing vascular cells with a protease, and (b) contacting a recombinant Paramyxovirus vector or cells containing such vector with the vascular cells, in which the steps (a) and (b) are carried out sequentially or simultaneously.

Treating with protease before administration of the vector into vascular cells may be preferred to achieve high efficiency of transfection. However, in clinical application where the time for blocking blood flow is limited, protease and vector may be mixed and administered simultaneously. In the present invention, it was confirmed that the vector infectivity into the medial layer is significantly enhanced by simultaneous administration, which simplifies the procedures for administration. Time for protease treatment may be determined so as to increase the vector infectivity, and is not limited. For instance, protease may be applied for a desired time between about 5 to 20 min at the indicated concentrations specified in the following Examples. Since high concentrations of collagenase may potentially cause physiological thrombosis, collagenase may be preferably used at a concentration not more than 5000 unit/ml, for instance, at 500 unit/ml. However, the concentration of protease and the time for treatment can be selected appropriately. Protease treatment may be performed at 37°C. Time for infection using vector after protease treatment may be chosen so as to ensure that the vector can be transfected into the target vascular cells, and is not limited. In clinical applications, it is desired to minimize the time for

infection so as to shorten the time in which blood flow is blocked. Time for infection may be several minutes, for instance, and specifically, a desired time between about 1 to about 10 min. The vector of the invention is capable of obtaining significant infection with 1 min exposure or longer. For instance, in gene transfer into the coronary artery, the time for blocking blood flow is desirably not more than 5 min, and, for instance, short period of time between about 1 to 5 min may be effectively used. *In vivo* gene transfer into the vascular lumen using protease treatment and vector administration may be performed by transferring a gene into the vascular lumen while blocking blood flow using the double balloon catheter, injecting forcefully using the infusion balloon catheter into the vascular smooth muscle layer, or pressing a vector to the vascular lumen using the hydrogel balloon catheter as described above. The infectivity may be improved by ablating the vascular endothelium before administration.

The transfection efficiency of virus vector may be further increased by administering virus vector together with biocompatible polyol (such as poloxamer 407) (March K.L. et al., Human Gene Ther. 6:41-53 (1995)). Thereby, the dose of virus vector can be reduced, or the time for infection may be shortened. In the present invention, biocompatible polyol may be combined with the Paramyxovirus vector of the invention to make a composition. Other type of biocompatible polyol may also be used. These agents may be administered with vector simultaneously or separately.

The vector of the present invention may be effectively administered in a form of matrix. In a known method, virus vector is suspended in atelocollagen matrix, and solidified to mini pellets by freeze-drying. This method utilizes the gradual degradation of the matrix and is reported to enable persisting the effect of adenovirus vector and naked DNA, whose expression is known to be transient (Ochiya T. et al., Nature Medicine 5:707-710 (1999)). The virus vector of the present invention can be mixed with such auxiliaries, and stored by freeze-drying. The vector may also be mixed with cationic lipid to enhance the level of expression.

It is known that a matrix so small as to be administered itself

is capable of releasing such as growth factor gradually through the 18G needle over a long period. For instance, preparation comprising such proteins as growth hormone has substantially longer duration in blood vessels than those administered alone. For instance, it may be 7 days or longer, but normally can be 10 days or longer (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Hei 10-001440). Accordingly, the numbers of administration and pain to the patients are markedly reduced. The preparation described above may be used as, for example, solid injection for subcutaneous and intramuscular administration (such as implants), or as mucoabsorbent such as suppository. The dosage form for injection may be column or granule that can be administered through a needle. Columnar form such as rectangular or cylindrical column, or spherical form may be used preferably.

The size of a parenteral preparation of the present invention may be selected depending on the administration method, but not limited as long as it does not bring excessive pain to patients. Injections composed of columnar matrix may be, for example, not more than 3 mm in diameter (e.g. 0.1 to 3 mm), and not more than 30 mm in length (e.g. 0.5 to 30 mm), preferably as small as not more than 1.3 mm in diameter (e.g. 0.1 to 1.2 mm) and not more than 20 mm in length (e.g. 0.5 to 20 mm), which facilitates injection through a 14G-needle or smaller, and more preferably a cylindrical column of 0.1 to 1 mm in diameter and 1 to 20 mm in length. Injections composed of spherical matrix may be not more than 1 mm (e.g. 0.1 μ m to 1 mm), preferably not more than 150 μ m (e.g. 0.5 to 100 μ m), and more preferably between 1 to 100 μ m, in the maximal diameter. The weight of matrix can be selected according to the form of preparation, for instance, not more than 40 mg, and preferably between 1 to 25 mg for injections.

The virus vector of the invention may be administered at a sufficient dose so that an effective dose of vectors can be transferred to vascular cells. Herein, the "effective dose" is defined as a dose that enables the introduction of genes to the cells of the target tissue so as to bring, at least partially, the desired therapeutic effect or preventive effect of the present invention. The administration of an effective dose of the virus vector containing

a desired gene enables the transfected cells to produce the gene product. Dose of the vector used for administration may vary depending on the disease, the body weight, age, sex, symptom, the purpose of administration, and the transfected gene, and so on, but it can be appropriately determined by those skilled in the art. The dose of the vector may be preferably within the range of approximately 10^5 pfu/ml to 10^{11} pfu/ml, and more preferably approximately 10^7 pfu/ml to 10^9 pfu/ml, but most preferably, the vector is administered at approximately 1×10^8 pfu/ml to 5×10^8 pfu/ml with pharmaceutically acceptable carriers.

The composition of the present invention containing the virus vector may be administered into subjects such as all mammalian animals including humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, and dogs.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a bar graph showing the dose-dependent transfection efficiency of SeV-luc into BSMC. Cells were seeded in 6-well plates at 10^5 cells/well, and SeV-luc at MOI=0.1, 1, 10, or 100, or wild-type SeV at MOI=100 (n=6 for each) was added. After 48 hr, cells were subjected to the luciferase assay. Data are expressed as means \pm S.D. Each dot represents the value from each well normalized by the protein concentration.

Figure 2 shows phase contrast microscopy photographs of BSMC that had been exposed to wild-type SeV (MOI=100) or various doses of SeV-NLS-lacZ (MOI=1, 10, and 100). The photographs show the dose-dependent transfection efficiency (n=6 for each). Forty-eight hours after gene transfer, cells were fixed in 2% paraformaldehyde plus 0.25% glutaraldehyde for 10 min, and incubated in X-Gal solution at room temperature for 1 hr. The number of cells containing nuclei clearly stained blue increased in dose-dependent manner. Original magnification: 100x.

Figure 3 is a bar graph showing the dose-dependent transfection efficiency of SeV-luc into human saphenous vein. Human saphenous vein, 5 to 10 mm in length, was washed extensively and immersed in vector solution containing SeV-luc at 10^7 , 10^8 , or 10^9 pfu (plaque forming

unit)/ml, or vector solution without virus. After 48 hr, the infected vein was subjected to the luciferase assay. Data are expressed as means \pm S.D. Each dot represents the value from each well normalized by the protein concentration.

5 Figure 4 is a bar graph showing the time-dependent increase in reporter gene expression in BSMC after transfection with SeV-luc or wild-type SeV (at MOI=10) (n=6 for each). Cells were harvested at the indicated time points after transfection, and subjected to the luciferase assay. The expression level of the transfected gene reached
10 a plateau 2 or more days after transfection. Data are expressed as means \pm S.D and shown in logarithmic scale. Each dot represents the value from each well normalized by the protein concentration.

Figure 5 shows the effect of SeV infection on the proliferation activity of BSMC. After plated, cells were infected with various doses
15 of recombinant wild-type SeV. The cell number was counted at the indicated time points. At MOI=1000, proliferation was significantly inhibited.

Figure 6 shows the time course of the expression of a foreign gene.

20 (a) shows the genomic stability in BSMC during the logarithmic phase. Cells were exposed to the various concentrations of SeV-luc (MOI=0.1, 1, and 10), and immediately before they reach 100% confluency, three quarters of the cells were subjected to the luciferase assay. The rest of the cells were subjected to passage culture. Each dot
25 represents the value at the indicated time point, which was normalized by the protein concentration. The experiments were performed in triplicate, and the representative results were shown. Data are expressed in logarithmic scale.

(b) shows the genomic stability in quiescent BSMC. The culture of
30 BSMC was rendered to be confluent, and left for additional two days. Cells were exposed to SeV-luc (MOI=10) for 1hr and subjected to the luciferase assay at the indicated time points (n=6 for each). Data are expressed as means \pm S.D and shown in logarithmic scale. Each dot represents the value from each well normalized by the protein
35 concentration.

Figure 7 is a graph showing the effect of vector exposure time

on SeV-mediated gene transfer.

(a) is a graph showing the effect of vector exposure time on SeV-mediated gene transfer in BSMC. BSMCs were exposed to SeV-luc (MOI=10) for a different time: 1, 2, 5, 10, 30, 60, or 180 min, or 24 or 48 hr and washed twice by immersing in fresh medium (n=6 for each). After 48 hr, cells were subjected to the luciferase assay. Data are expressed as means \pm S.D and shown in logarithmic scale. Each dot represents the value from each well normalized by the protein concentration.

(b) is a graph showing the effect of vector exposure time on SeV-mediated gene transfer in human saphenous vein. Human great saphenous vein, 5 to 10 mm in length, was exposed to SeV-luc (MOI=10) for 1, 2, 5, 10, 30, or 60 min, or 3 or 6 hr, washed four times by immersing in fresh medium, and then plated in culture plates (n=6 for each). After 48 hr, the infected vein was subjected to the luciferase assay. Data are expressed as means \pm S.D, and shown in logarithmic scale. Each dot represents the value from each well normalized by the protein concentration.

Figure 8 is a graph showing the effect of vector exposure time on recombinant adenovirus vector-mediated gene transfer into BSMC. BSMCs were exposed to AdexCA-lacZ (Ueno H. et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15:2246-2253 (1995)) at MOI=10 for 1, 2, 5, 10, 30, 60, or 180 min or 24 or 48 hr and washed twice by immersing in fresh medium (n=6 for each). After 48 hr, the infected cells were subjected to the luminescent β -galactosidase assay. The expression of the transfected gene clearly increased depending on the vector exposure time. Data are expressed as means \pm S.D, and shown in logarithmic scale. Each dot represents the value from each well normalized by the protein concentration.

Figure 9 shows stereomicrograph and light micrograph of human saphenous vein expressing β -galactosidase tagged with the nuclear localization signal, which was transfected by exposing SeV-NLS-lacZ (5×10^8 pfu) to the lumen of human saphenous vein for 10 min with injection pressure at 150 mmHg (n=6 for each). After 2 days, the infected vein was fixed in 2% paraformaldehyde plus 0.25% glutaraldehyde for 10 min, and incubated in X-Gal solution at room temperature for 3 hr.

(a) to (c) show typical stereomicroscopic observations of the vein exposed to SeV-NLS-lacZ with injection pressure at 150 mmHg. Blue spots intensely stained were found at high frequency distributed on the luminal surface (a) and in adventitia (b). The white region looking like a railway indicates the place in which the gene was not transfected, where the endothelium had been removed by injury during operation (a: arrowhead). A zonal blue line was frequently observed in adventitia, which indicates the gene transfer into vasa vasora (vessel wall nutrient vessel) (b: arrow). Blue spots were absent from the vein infected with wild-type SeV (c). The original magnifications are 12x for (a), 36x for (b), and 8x for (c).

(d) and (e) show the histological observations of the same vein as shown in (a) to (c). Most of luminal endothelial cells (d) and some of the adventitial vasa vasora and cells surrounding the vessel (e) were stained blue intensely. Nuclei were counter-stained with fast red. The original magnification is 200x for (d and e).

Figure 10 shows photographs for stereomicroscopic observation and light microscopic observation showing the result of examination for β -galactosidase expression in the balloon-injured vein transfected with SeV-NLS-lacZ (5×10^8 pfu) by exposing to the lumen of the balloon-injured vein at injection pressure 150 mmHg for 10 min (n=6 for each). After 2 days, the infected vein was fixed in 2% paraformaldehyde plus 0.25% glutaraldehyde for 10 min and incubated in X-Gal solution for 3 hr at room temperature.

(a) and (b) show typical stereomicroscopic observations of the balloon-injured vein exposed to SeV-NLS-lacZ at injection pressure 150 mmHg. The blue spots on the luminal surface disappeared markedly, and became sporadic (a, Compare with Figure 9a). In addition, zonal blue lines were also found in adventitia, indicating the gene transfer into vasa vasora (b: arrowhead). The original magnifications are 8x for (a) and 12x for (b).

(c) to (e) show the histological observations of the same vein as shown in (a) and (b). Most of the luminal endothelial cells were ablated, and accordingly, the vein was negative for X-Gal staining, whereas blue cells were found in thin neointima sporadically (c: arrow).

(d) shows histological observations of another vein containing

thick neointima. Note that blue cells were absent from the luminal surface and neointima except some blue cells in boxed area.

(e) shows a higher magnification image of (d). Some of the neointimal capillaries were positive for X-Gal staining. Nuclei were counter-stained by fast red. The original magnification is 200x for (c), 60x for (d), and 200x for (e).

Figure 11 shows photographs for stereomicroscopic observation and light microscopic observation for β -galactosidase expression in the balloon-injured vein, which was transfected by exposing SeV-NLS-lacZ (5×10^8 pfu) to the lumen of the vein at injection pressure 150 mmHg for 10 min ($n=6$ for each). Two days after transfection, the vein was fixed in 2% paraformaldehyde plus 0.25% glutaraldehyde for 10 min, and incubated for 3 hr in X-Gal solution at room temperature.

(f) and (g) show histological observations of another vein having neointima torn apart. In (f), as in Figures 10(c) to (e), most of the luminal endothelial cells and the neointimal cells were negative for X-Gal staining, whereas blue cells were present in media and adventitia sporadically. (g) shows a higher magnification image of the boxed area in (f). Some of the vascular smooth muscle cells with spindle-shape were clearly positive for X-Gal staining (arrow). Nuclei were counter-stained by fast red. The original magnifications are 60x for (f) and 200x for (g).

Figure 12 shows photographs representing the result of *in vivo* gene transfer into rabbit carotid. Two days after SeV-NLS-lacZ (5×10^7 pfu) was transfected into the carotid, the carotids were dissected and stained with X-Gal, and then sections were prepared.

Figure 13 shows the result of *ex vivo* SeV vector-mediated gene transfer into rat thoracic artery.

(a) shows the dose-dependent transfection efficiency of GFP/SeV into rat thoracic artery. Dissected rat thoracic artery was immersed in 100 μ l of Hanks solution containing GFP/SeV at the indicated concentrations for 10 min and washed twice. The infected arteries were plated on 24-well plates and cultured in DMEM containing 10% FBS in a CO₂ incubator for 48 hr. The arteries were examined by fluorescence light microscopy, and the cell number per 1 mm² was counted ($n=6$ for each). Data indicates dose-dependent transfection of

GFP/SeV.

(b) shows time-dependent transfection efficiency of GFP/SeV into rat thoracic artery. Dissected rat thoracic artery was immersed in solution containing GFP/SeV at 1×10^8 pfu/ml for the indicated times and washed twice. The arteries were plated on 24-well plates and cultured in DMEM containing 10% FBS in a CO₂ incubator for 48 hr. The arteries were examined by fluorescence light microscopy, and the cell number per 1 mm² was counted (n=6 for each).

(c) shows a comparison of transfection efficiencies into rat thoracic artery between SeV and adenovirus vectors. Dissected rat thoracic artery was immersed in solution containing LacZ/SeV or LacZ/Adenovirus at the indicated concentrations for 2 min and washed twice. The infected arteries were plated on 24-well plates and cultured in DMEM containing 10% FBS in a CO₂ incubator for 48 hr. The arteries were fixed for 10 min and stained for 3 hr using the β -galactosidase staining kit. The cell number per 1 mm² was counted (n=6 for each).

Figure 14 is a diagram representing the elevation of transfection efficiency of SeV into blood vessel by pretreatment with protease. Dissected rat thoracic arteries were pretreated with various proteases for 5 min before transfection. Hanks solution containing protease was pre-warmed for 10 min. The arteries were immersed in Hanks solution containing LacZ/SeV (1×10^8 pfu/ml) for 2 min, washed, and cultured for 48 hr. The arteries were stained for 3 hr for the detection of β -galactosidase activity. Collagenase type 4 (COL), urokinase (uPA), tissue plasminogen activator (tPA), elastase (EL), and matrix metalloproteases (MMP9 and MMP2), which were preactivated with APMA, were used (n=5 for each).

Figure 15 shows photographs representing the result of *ex vivo* SeV vector-mediated gene transfer into rat media by protease pretreatment. Sections of the rat thoracic arteries transfected with SeV in Figure 14 were shown. Nuclei were counter-stained with fast red. The cells successfully transfected were limited to the vascular endothelial cells in the arteries untreated, or those treated with elastase, urokinase, or tPA. In contrast, in the arteries pretreated with collagenase type 4, MMP9, or MMP2, transfected cells were found in the medial vascular smooth muscle cells beyond basal lamina. Enzymes

transfected into media are capable of digesting basal lamina, suggesting that digestion of the basal lamina is essential for transfection into media. Moreover, although it was impossible to transfer genes into media using tPA alone, transfer into media was possible in the presence of medium containing 10% FBS. This could be because tPA digested plasminogen in serum, and thereby active plasmin was produced.

"untreated": without protease treatment, "elastase": treated with elastase, "collagenase": treated with collagenase type 4, "MMP9": treated with activated MMP9, "uPA": treated with urokinase, "MMP2": treated with activated MMP2, "tPA": treated with tPA, and "tPA+10% FBS": treated with tPA in the presence of 10% FBS.

Figure 16 is photographs representing the result of *in vivo* SeV-mediated gene transfer into rat vascular media by protease pretreatment. To examine the effect of protease pretreatment on *in vivo* gene transfer, rat abdominal aorta and carotid arteries were subjected to gene transfer mediated by SeV vector. Sections of rat abdominal aorta (A, B, C, and D) and rat carotid arteries (E and F) transfected with NLS-lacZ/SeV were shown. For gene transfer into the abdominal aorta, rats were subjected to ventrotomy. After the arteries and veins were ablated from abdominal aorta, the branch was clipped to stop blood flow, and protease was injected using the needle for insulin injection. After 5 min, the aorta was washed extensively with saline and injected with 25 μ l of NLS-lacZ/SeV (1×10^9 pfu/ml). After 2 min, blood flow was reestablished. After 3 days, the infected vessels were dissected, fixed, and stained using the β -galactosidase staining kit. For gene transfer into rat carotids, the arteria carotis communis were transfected by similar procedures as described above, except that, in F, the carotids were washed with saline and then administered with protease and vector simultaneously by injecting 10 μ l of 1:1 mixture of collagenase type 4 solution (final 500 unit/ml) and NLS-lacZ/SeV solution (final 1×10^9 pfu/ml). After 5 min, blood flow was reestablished. After 3 days, the infected vessels were dissected, fixed and stained using the β -galactosidase staining kit. In the artery without protease treatment, SeV transfection was only found into the vascular endothelial cells, whereas, in the arteries pretreated with

such enzymes, the vector was transfected into media. The medial gene transfer was also observed in the artery treated with protease and vector simultaneously.

5 "untreated": without protease treatment, "MMP9": treated with activated MMP9, "plasmin": treated with plasmin, "MMP2": treated with activated MMP2, and "collagenase": treated with collagenase type 4.

10 Figure 17 shows photographs of human great saphenous vein subjected to ex vivo SeV vector-mediated gene transfer by protease treatment. Human great saphenous veins obtained from patients of lower limb varix on surgery were used to examine the effect of protease treatment on ex vivo SeV vector-mediated gene transfer into neointima. Sections of the vein without protease treatment (A), the veins simultaneously treated with MMP2 and NLS-lacZ/SeV (1×10^9 pfu/ml) (B), or the veins simultaneously treated with plasmin and NLS-lacZ/SeV (C) are shown. Treatment with MMP2 or plasmin enabled
15 transfection into neointima underneath basal lamina.

"untreated": without protease treatment, "MMP2": treated with activated MMP2, and "plasmin": treated with plasmin.

20 Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention is illustrated in detail below with reference to examples, but it is not to be construed as being limited thereto. All the references (including references, patents, and published patent applications) cited herein are incorporated by
25 reference. The methods used in the Examples are described below.

i) Cells and in vitro gene transfer

Bovine aorta smooth muscle cells (BSMC) were prepared from bovine aorta as described previously (Yonemitsu Y. et al., Lab. Invest. 75:313-323 (1996); Yonemitsu Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 231:447-451 (1997); Yonemitsu Y. et al., Circ. Res. 82:147-156 (1998)). COS7 cells, which are African green monkey kidney cells transformed with simian virus 40 large T antigen, and human embryonic kidney cells (HEK293) were obtained from ATCC (American Type Culture Collection).
35 Cells were cultured in plastic dishes containing Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).

BSMC at passages 6 to 8 were used in the experiments. In all the experiments, transfection was performed by adding a solution of various concentrations of vector to the culture medium. Except in Figure 4, each reporter gene was assayed at 48 hr after transfection unless
5 otherwise specified. Details of each experiment were described herein and legend in the figures.

ii) Luciferase assay and luminescent β -galactosidase assay of cultured cells.

10 Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 1 mM KH₂PO₄, pH 7.2), and treated with 200 μ l of 1x Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Madison, MA). The cell lysates were transferred into 1.5 ml Eppendorf tubes, and centrifuged at 15,000
15 rpm to remove cell debris. In luciferase assay, 20 μ l of the supernatant was added to 100 μ l of luciferase assay buffer (Promega), and the relative activity of luciferase was measured on a luminometer (Model LB9507, EG&G Berthold). In luminescent β -galactosidase assay, 20 μ l of the supernatant was added to 200 μ l of β -galactosidase reaction
20 buffer (Clontech Inc., Palo Alto, CA), and the relative activity of luciferase was measured on a luminometer. Concentration of the proteins was determined by Bradford method using a commercial protein assay system (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hertfordshire, UK), and data were expressed as RLU (relative light unit)/mg protein.
25 Representative results were obtained by repeating experiments at least three times.

iii) X-Gal histochemistry of cultured cells

Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice
30 with PBS, and fixed with 2% formaldehyde for 10 min. Cells were washed twice by immersing in PBS containing 0.1% Triton X-100, then X-Gal solution (0.2% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, 1 mM K₄(CN)₆, 3.3 mM K₃(CN)₆, 60 mM Na₂HPO₄, and 40 mM NaH₂PO₄) was added to each well, and the mixture was left at room temperature for 1 hr.
35 The staining reaction was terminated by immersing cells in PBS, and cells were examined under phase contrast microscope.

iv) Gene transfer into human saphenous vein and cultured organs

Human great saphenous veins were prepared freshly from patients during ablation of the varix in the lower limb, and subjected to one of the following two different gene transfer methods at random. Twenty veins were collected (male: 6, female: 14; age: 22 to 82, average 57.4), from which two veins having obvious phlebitis were excluded. The veins obtained were cut into several sections and used for the following experiments.

1. Simple floating method:

Eighty-five sections were used in total (56 for luciferase assay and 29 for X-gal histochemistry). Veins were washed four times with PBS, and further washed three times with DMEM supplemented with 10% FBS to remove blood. The veins were sliced into sections of 5 to 10 mm length, and immersed in fresh medium containing various concentrations of vector. At an appropriate time point, the veins were washed by immersing in culture medium, transferred into 6-well plates, and cultured (organ culture).

2. Gene transfer into lumen:

Total 71 sections were used. Veins were cut at 3 to 4 cm intervals to prepare segments. To ensure that valve does not interfere with injection, the external cylinder of the 24G needle was inserted into the segments from the distal end, and tied with 2-0 silk thread. The distal end was fixed by vessel clamps. Two ml of vector solution containing various concentrations of vector was injected into the luminal space with continuous positive pressure (measured by hemodynamometer) at 0 (mock exposure: n=24), 150 mmHg (n=11), 300 mmHg (n=9), or 760 mmHg (n=5), and incubated for 10 min. Some of the segments were injured on the endothelium by scraping with the 4 Fr Forgarty catheter (0 mmHg: n=7, 150 mmHg: n=6, 300 mmHg: n=9). After 48-hr organ culture, the segments were subjected to an appropriate reporter assay.

v) X-Gal histochemistry of human vein

Forty-eight hours after transfection, the segments of veins were immersed in and washed with PBS, and fixed with 2% formaldehyde plus

0.25% glutaraldehyde for 10 min. Then, the segments were immersed in and washed with PBS containing 0.1% Triton X-100, and incubated in X-Gal solution for 3 hr on a reciprocal shaker. X-gal stained samples were further fixed with phosphate-buffered formalin, and examined under stereomicroscope. Then, the samples were cut at about 5 mm intervals to prepare smaller segments, which were embedded in paraffin (1 to 6 segments/tissue) to prepare sections of 3 μ m in thickness. Thus obtained sections were stained with nuclear fast red or ordinary hematoxylin-eosin staining, and examined under light microscope. The numbers of examined tissue sections are shown in Table 1.

vi) Luciferase assay of human vein

Forty-eight hours after transfection, the segments of veins were immersed in and washed with PBS, and cut into small pieces with scissors in 500 μ l of 1x Cell Culture Lysis buffer. Cell lysates were centrifuged at 15,000 rpm for 5 min at 4°C, and 20 μ l of the supernatant was subjected to the luciferase assay using a luminometer as described above.

vii) Antibodies and immunohistochemistry

Primary antibodies used in the Examples are as follows; a monoclonal antibody against CD34 (Dakopatts) for endothelial cells, and a monoclonal antibody against HHF35 (Enzo Co., Farmingdale, NY) for vascular smooth muscle cells. Immunohistochemistry was performed by the standard avidin-biotin complex method (Hsu S.M. et al., J. Histochem. Cytochem. 29:577-580 (1981a)) with minor modifications. Briefly, thin sections of veins that had been stained with X-Gal and embedded in paraffin were depleted of paraffin completely, and treated with normal rabbit serum (1:10 dilution) for 30 min to block non-specific binding. The sections were incubated with primary antibodies (or with non-sensitized mouse IgG as a negative control) at 4°C overnight. The sections were treated with methanol solution containing 0.3% H₂O₂ for 30 min to block endogenous peroxidase activity, and then incubated with biotin-conjugated rabbit anti-mouse IgG+IgA+IgM antibodies (Histofine SAB-PO(M) kit; Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan) for 30 min. The sections were washed extensively with PBS, then incubated with avidin-biotin-conjugated horse radish peroxidase complex

(Nichirei Co Ltd.), and finally developed by incubating with 0.03% H₂O₂ and 0.1% diaminobenzidinetetrahydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany).

5 viii) Statistical analysis

All data were expressed as means \pm standard deviation (S.D.). Data were analyzed by Mann-Whitney U-test, and the null hypothesis was rejected at $p < 0.05$.

10 [Example 1] Construction and reconstitution of recombinant Sendai virus vectors

Recombinant SeV was constructed as previously described (Kato A. et al., Genes Cells 1:569-579 (1996); Kato A. et al., EMBO J. 16:578-587 (1997); Yu D. et al., Genes Cells 2:457-466 (1997); Hasan M.K. et al., J. Gen. Virol. 78:2813-2820 (1997); Sakai Y. et al., FEBS Lett. 456:221-226 (1999)). First, an 18 bp spacer sequence containing the NotI site (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3'; SEQ ID NO: 3) was inserted into the region between the 5'-untranslated region and the initiation codon of the gene encoding nuclear (N-) protein. Thus cloned SeV genome also contains the self-cleaving ribozyme site derived from the antigenomic strand of hepatitis virus delta (Kato A. et al., Genes Cells 1:569-579 (1996)). Full length cDNA encoding luciferase and *E.coli* lacZ gene containing the nuclear localization signal (NLS) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers containing the NotI site and a set of SeV E and S signal sequence tags for a foreign gene. The amplified products were inserted into the NotI site of the cloned SeV genome. Total length of a template SeV genome containing a foreign gene was adjusted to be a multiple of hexamer (so called "the rule of six"; Kolakofsky D. et al., J. Virol. 72:891-899 (1998)). The template SeV genome containing foreign gene and plasmids encoding N-, P-, and L-protein (pGEM-N, pGEM-P, and pGEM-L, respectively) were mixed with a commercial cationic lipid to form a complex, and the complex vaccinia virus vT7-3 were co-transfected into CV-1 or LLMCK2 cells (Fuerst T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:8122-8126 (1986)). After 40 hr, cells were disrupted by freeze-thawing three times, and injected into the

chorioallantoic lumen of 10-day-old embryonated chicken eggs. The resulting recombinant virus was collected, and re-amplified in chicken eggs to get rid of vaccinia virus. The virus titer was determined by measuring hemagglutination activity using chicken erythrocytes (Yonemitsu Y. and Kaneda Y. Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells. Ed. by Baker A.H. Molecular Biology of Vascular Diseases. Methods in Molecular Medicine: Humana Press, pp. 295-306 (1999)). Virus-containing allantoic solution is prepared as a composition containing the recombinant virus vector of the present invention (SeV-NLS-lacZ), and stored at -80°C as a frozen stock until use. A composition containing another recombinant virus vector, SeV-luc (Hasan M.K. et al., J. Gen. Virol. 78:2813-2820 (1997)), was similarly prepared.

[Example 2] Dose-dependent transfection of SeV *in vivo* and *ex vivo*

Logarithmically growing cultures of an established cell line, COS7 cells and human embryonic kidney HEK293 cells, both of which are well known to be easily transfected, as well as BSMC were used to estimate the dose-dependent SeV-mediated gene transfer. Forty-eight hours after SeV-luc transfection, in both COS7 cells and HEK293 cells, luciferase expression was increased in dose-dependent manner, and it reached a plateau at titers higher than MOI=3 (data not shown). Under similar conditions, the luciferase expression in BSMC also increased in dose-dependent manner, and continued to increase even at MOI=100, as shown in Figure 1 (n=6 for each; untreated control: 46,990.57±3,849.08 RLU (relative light unit)/mg; mock transfection where wild-type SeV was used at MOI=100: 4.3±0.3 ($\times 10^4$) RLU/mg; SeV-luc at MOI=0.1: 4.1±0.2 ($\times 10^4$) RLU/mg; SeV-luc at MOI=1.0: 4.5±0.6 ($\times 10^9$) RLU/mg; SeV-luc at MOI=10: 3.4±0.2 ($\times 10^{10}$) RLU/mg; and SeV-luc at MOI=100: 9.5±0.7 ($\times 10^{10}$) RLU/mg). Next, the present inventors evaluated the transfection efficiency using SeV-NLS-luc (n=3 for each, Figure 2). X-Gal histochemistry showed that the frequency of blue-stained cells was increased in dose-dependent manner, and that, at MOI=100, 90% or more BSMC became positive.

Next, the present inventors examined whether the recombinant SeV was capable of being transfected into human vessel wall, using

human great saphenous veins that were obtained on surgery. Segments of veins, each 5 to 10 mm in length, were incubated in vector solution containing SeV-luc at different concentrations for 1 hr, washed 4 times by immersing in medium, and then immediately cultured in fresh medium (n=6 for each). After 48 hr, luciferase activity was measured. Data in Figure 3 show that the luciferase activity increased clearly in dose-dependent manner as in BSMC (n=6 for each; untreated control: 1.7 ± 0.4 ($\times 10^4$) RLU/mg; SeV-luc (10^7 pfu): 1.2 ± 0.2 ($\times 10^8$) RLU/mg; SeV-luc (10^8 pfu): 1.2 ± 1.0 ($\times 10^9$) RLU/mg; SeV-luc (10^9 pfu): 2.7 ± 0.8 ($\times 10^9$) RLU/mg).

[Example 3] Time-dependent gene expression level after SeV-mediated gene transfer in vitro

To get information on time-dependent expression of a foreign gene transfected by SeV, the present inventors evaluated the luciferase activity in BSMC at certain time points after treatment with SeV-luc at MOI=10 (n=6 for each point). As shown in Figure 4, significant luciferase activity was already detected just 1 hr after transfection, and the expression level increased logarithmically in time-dependent manner (mock transfection: 4.6 ± 0.4 ($\times 10^4$) RLU/mg; 1 hr after transfection: 2.3 ± 0.3 ($\times 10^6$) RLU/mg; 6 hr after transfection: 1.9 ± 0.3 ($\times 10^7$) RLU/mg; 12 hr after transfection: 1.9 ± 0.1 ($\times 10^8$) RLU/mg; and 24 hr after transfection: 2.9 ± 0.5 ($\times 10^{10}$) RLU/mg). The luciferase activity reached a plateau 2 to 3 days after transfection (2 days after transfection: 2.1 ± 0.2 ($\times 10^{11}$) RLU/mg; and 3 days after transfection: 3.7 ± 0.2 ($\times 10^{11}$) RLU/mg). Accordingly, the assay was usually performed 2 days after transfection in the following Examples.

[Example 4] Effect of SeV-mediated gene transfection on cell proliferation

Next, the present inventors examined the effect of SeV-mediated gene transfection on the proliferation of BSMC to evaluate the cytotoxicity of the vector against BSMC. As shown in Figure 5, the proliferation of BSMC was not inhibited by the infection of wild-type SeV up to MOI=100. However, on day 8 at MOI=1,000, the cell proliferation was clearly inhibited ($p < 0.01$).

[Example 5] Time course of foreign gene expression

Paramyxoviridae including SeV replicate their genome and express there genes in the host cytoplasm. This suggests stable expression of reporter genes in the daughter cells. However, the expression level of therapeutic genes could be affected by genome having DI (defective interfering) effect or by possibility of accumulation of spontaneous mutations (Calain P. et al., Virology 212:163-173 (1995)). To test this, the present inventors evaluated the time course of reporter gene expression after SeV-luc-mediated gene transfer using proliferating cells or quiescent cells, in a series of the following experiments.

First, BSMCs growing logarithmically in 75 mm² flasks were infected with SeV-luc at MOI=0.1, 1, and 10. At the indicated time points, three quarters of the cells were subjected to luciferase assay, and the rest of them were subjected to passage culture. For the three different dosages, the luciferase expression was sustained at high level until day 37 and relatively stable (Figure 6a). The experiment was repeated three times, and similar results were obtained.

Next, the present inventors evaluated the time course of reporter gene expression using quiescent BSMC, as follows. Cells were rendered to be confluent (dense), and left for additional 2 days or longer to stop cell cycle. More than 95% of BSMCs were made to be in the G1/G0 phase using FACScan (data not shown). The quiescent BSMCs were exposed to SeV-luc at MOI=0.1, 1, and 10 for 1 hr, and subjected to luciferase assay at the indicated time points (n=6 for each, Figure 6b). The expression of the foreign gene reached the maximum level on day 2 ($1.1 \pm 0.4 \times 10^{11}$ RLU/mg) and was gradually falling down as time passed. The luciferase activity reached the lowest level on day 14 ($2.1 \pm 0.8 \times 10^{10}$ RLU/mg). Then, the luciferase activity began increasing gradually, and kept increasing at least until day 28. These results indicate that the expression of a gene transfected by SeV can be sustained at relatively high level over at least 1 month.

[Example 6] Effect of vector exposure time on SeV-mediated gene transfer into BSMC and human saphenous vein

The current vectors used for gene transfer require relatively long exposure time, which is considered as one of the major limitations on the vectors when they are used in clinical applications. To check this in the SeV-mediated gene transfer system, the present inventors examined the dependency of the transfection efficiency on exposure time using quiescent BSMC and human saphenous vein.

For BSMC, cells were plated in 6-well plates, rendered to be confluent, and left for additional 2 days. It is confirmed using FACSscan that more than 95% of BSMCs were in the G0/G1 phase (data not shown). SeV-luc (MOI=10) was added to the each wells. The medium was removed after 1, 2, 5, 10, 30, 60, and 180 min, and 24 and 48 hr, and cells were washed twice with fresh medium. Then, 2 ml of DMEM containing 10% FBS was added to the wells. Forty-eight hours after transfection, cells were subjected to luciferase assay as described above.

Interestingly, as shown in Figure 7a, SeV-mediated luciferase gene expression was hardly affected by the time for interaction between the vector and cells: 1 min exposure was enough to achieve similar level of luciferase activity to that obtained by 48 hr exposure (n=6 for each).

The above findings were representatively observed in human saphenous veins (Figure 7b) as well, and similar findings were also observed when BSMCs were transfected with SeV-NLS-lacZ. As shown in Figure 7b, treatment for just 1 min with vector solution was enough to achieve a similar level of luciferase activity to that obtained by 48 hr treatment. These results indicate that the time for interaction between the vector and cells is not critical for SeV-mediated gene transfer.

In contrast, the transfection activity of a lacZ-encoding adenovirus vector was dependent on the incubation time under similar conditions, as reported previously (Guzman R.J. et al., Circulation 88:2838-2848 (1993)) (Figure 8).

[Example 7] Efficiency of transfection into human saphenous vein.

To identify the exact cell types that are transfected by SeV-mediated gene transfer in human blood vessel, human great saphenous

veins were obtained from patients upon ablation of the varix. The merits of their use are (1) that one can use diseased human blood vessels containing various degrees of myofibrillar neointima, (2) that it is easy to obtain vessels in large quantity, and (3) that one can avoid bacterial contamination, which happens frequently. Conversely, the disadvantages are (1) that ECs can be easily lost by manipulations, and (2) that such veins tend to have severe fibrosis in the vessel wall and reduced number of medial cells.

First, the present inventors evaluated the gene transfer through the lumen using different pressures for injection. Two milliliter of SeV-NLS-lacZ (5×10^8 pfu) was injected into 3- to 4-cm vein segments with pressure 0, 150, 300, and 760 mmHg for 10 min (n=6 for each). The vector solution was also injected using the same pressures into the vessels injured by the balloon catheters (n=6 for each). As a control, wild-type SeV was injected (n=6). The gene expression was estimated by X-Gal staining after 48 hr.

The viability of vein cells was evaluated by counter staining of the nuclei using Hematoxylin (Table 1). In the group that had been treated with 760 mmHg, the numbers of CD34 positive EC and HHF35 positive VSMC were clearly reduced in all five segments; therefore, the group was excluded from further evaluations. In the group injured with the balloon catheters, the luminal surface was found severely injured; therefore, the ECs of the lumen were not evaluated. For other groups, there was no significant difference in the average cell number among groups; therefore, they were evaluated by X-Gal staining.

Table 1

Viability of cells in human great saphenous vein

	Uninjured				Balloon-injured			Simple floating Average cell number/segment (range) (n=20)
	Average cell number/segment (range)				Average cell number/segment (range)			
	0 mmHg (n=36)	150 mmHg (n=24)	300 mmHg (n=22)	760 mmHg (n=5)	0 mmHg (n=6)	150 mmHg (n=3)	300 mmHg (n=19)	
CD34 (+) ECs* (lumen)	31.1 (0-277)	61.6 (0-235)	9.1 (0-68)	0.2 (0-1)	(-)	(-)	(-)	10.0 (0-46)
HHF35 (+) VSMCs** (neointima)	129.1 (25-385)	77.0 (23-132)	85.3 (20-238)	34.5 (2-67)	170.3 (78-253)	57.3 (46-53)	112.1 (43-233)	132.2 (55-225)
HHF35 (+) VSMCs (media)	20.0 (9-56)	18.8 (4-45)	21.5 (7-66)	9.3 (3-37)	27.0 (22-32)	22.3 (13-32)	36.6 (12-81)	20.9 (9-42)
Adventitia	212.0 (46-472)	212.2 (86-548)	197.3 (30-374)	139.2 (110-159)	247.5 (130-433)	109.3 (90-132)	139.3 (30-230)	177.9 (132-288)

*ECs: endothelial cells, **VSMCs: vascular smooth muscle cells

Examination of the vessels exposed to SeV-NLS-lacZ with different injection pressures revealed that blue spots intensely stained were distributed at high frequency on the luminal surface and in adventitia (Figures 9a and b). Blue spots were not found in the vessel exposed to the wild-type SeV (Figure 9c). Using histological tests, most of the blue cells were identified as ECs on the luminal surface or those of vasa vasora, and as fibroblasts in adventitia (Figures 9d and e). This was confirmed by immunohistochemistry (data not shown).

In the balloon-injured vessel, the number of blue spots on the luminal surface was greatly reduced (Figure 10a), whereas the number in adventitia including vasa vasora was similar to that in uninjured vessels (Figure 10b, arrowhead). The results were confirmed by histochemistry; cells containing blue nuclei were sparsely distributed in vessels having thin neointima (Figure 10c, arrowhead), whereas few of them were observed in vessels having thick neointima, except scattered capillary ECs (Figures 10d and e, arrow). Certain area of broken neointima was found to contain medial cells positive for X-Gal at relatively high frequency, which suggests that the transfection efficiency of SeV vector into vascular smooth muscle cells may not be low (Figures 11f and g, arrow). These results indicate that neointima substantially interferes with SeV-mediated gene transfer into human blood vessels whereas ECs do not.

Sections were further subjected to immunohistochemistry to determine the ratio of X-gal positive cells in intima, media, and adventitia (Table 2). At all injection pressures, the efficiency of SeV-mediated transfection into the uninjured vein was almost equal to that obtained by simple floating method, whereas the number of transfected cells was slightly increased at 300 mmHg in neointima using the injured vein. Additionally, when neointima was torn, there was obvious increase in the number of X-Gal positive cells in media and adventitia at 300 mmHg. This is consistent with the histological data shown in Figures 11f and g. The efficiency of transfection into neointima was still low in torn samples, which suggests that the vector permeability into neointima area is low.

Ex vivo transfection efficiency into human great saphenous vein

Table 2

	Uninjured % blue cells/total \pm S.D.			Balloon-injured % blue cells/total \pm S.D.			Torn sample at 300 mmHg % blue cells/total \pm S.D. (n=4)	Simple floating % blue cells/total \pm S.D. (n=20)
	0 mmHg (n=36)	150 mmHg (n=24)	300 mmHg (n=22)	0 mmHg (n=6)	150 mmHg (n=3)	300 mmHg (n=19)		
CD34 (+) ECs* (lumen)	91.6 \pm 13.0	89.5 \pm 13.7	94.2 \pm 9.1	(-)	(-)	(-)	79.2 \pm 24.1	92.3 \pm 11.8
HHF35 (+) VSMCs** (neointima)	3.8 \pm 4.0	15.4 \pm 16.1	2.3 \pm 4.0	1.7 \pm 3.0	0	26.3 \pm 5.0	2.2 \pm 3.8	1.5 \pm 1.2
HHF35 (+) VSMCs (media)	4.0 \pm 13.9	0	0	0	0	5.0 \pm 15.8	40.2 \pm 38.5	0
Adventitia	17.7 \pm 14.3	26.7 \pm 20.5	36.7 \pm 21.2	15.7 \pm 12.8	3.0 \pm 4.0	29.3 \pm 24.4	78.1 \pm 9.0	20.5 \pm 38.5

*ECs: endothelial cells, **VSMCs: vascular smooth muscle cells

[Example 8] In vivo gene transfer into rabbit carotid artery

Male Japanese White rabbits (2.5 to 3.5 kg in weight) anesthetized with pentobarbital were cut at the neck by midline incision, and the carotid arteries were exposed. Sheath of adventitia surrounding the media was picked up by fine forceps, and appropriate amount of SeV-NLS-lacZ (5×10^7 pfu) (usually approximately 500 μ l) was injected using 26-gauge needle, with media kept uninjured. Then, the incision was sewed up together.

After 2 days, rabbits were anesthetized again with pentobarbital, the incision was opened, and 18-gauge elastase was inserted through the external carotid. After the lumen was washed with saline containing heparin, the arteries were cut off and fixed with fixative solution (2% paraformaldehyde plus 0.25% glutaraldehyde) for 10 min. The vessels were washed extensively with PBS, immersed in X-Gal solution, and incubated at room temperature for 3 hr on a shaker. Then, the vessel walls were washed with a large volume of PBS, fixed again with neutral formalin, and sectioned. As a result, the nuclei of adventitia cells were stained blue, indicating that SeV-mediated gene transfer into vascular cells was effective *in vivo* as well (Figure 12).

By similar methods, it is possible to transfer a gene into the lower limb bypass grafted vessel wall, coronary aorta in heart, or so on.

Injection into the lumen using positive pressure may be performed as follows. For rabbits, Japanese White rabbits anesthetized with pentobarbital plus ketamin were cut at the neck by midline incision, and the right common carotid artery, internal carotid artery, and external carotid artery were exposed. The branch vessels from the common carotid artery were bent up, and the common carotid artery and internal carotid artery were clamped at the end closer to the heart and the end closer to the head, respectively. A small hole was made on the external carotid artery wall using small scissors, and the 18-gauge double lumen catheter was kept against internal carotid artery. One end of the catheter was opened, and approximately 5 cc of buffer was injected through the other end to wash out blood components completely. Then, one end was closed and the other was connected with

hemodynamometer. Virus solution was injected through trivalve junction linked to the tube connecting with hemodynamometer, and the lumen was filled. The end was closed, arbitrary pressure (normally 150 mmHg) was applied by hemodynamometer, and the artery was left for 10 min. The virus solution was recovered, the catheters were removed, and the external carotid was tied. The common carotid artery and internal carotid artery were opened to reestablish blood flow.

[Example 9] Ex vivo gene transfer of SeV vector into rat thoracic artery

The efficiency of SeV-mediated gene transfer into rat artery was examined using rat thoracic arteries. Wister rats (Charles River), 9- to 12-week-old male, anesthetized with Nembutal were subjected to ventrotomy, and the thoracic aorta was dissected. The blood vessels were washed with Hanks solution (GIBCO BRL), and tubular portions cut vertically into laminar pieces. The laminae were further cut into approximately 4 x 5 mm laminae. The laminae were washed with Hanks solution, and immersed for 10 min in Hanks solution which contained GFP/SeV expressing GFP or SeV-NLS-lacZ at the indicated concentrations. The samples were washed twice with Hanks solution, and cultured in DMEM (GIBCO BRL) containing 10% FBS (GIBCO BRL) in an incubator at 5% CO₂. The next day, the medium was replaced with fresh one. After an additional day, the samples were fixed and stained for 3 hr using the β -gal staining kit (Invitrogen). After cell number was counted, cells were post-fixed, and frozen sections and paraffin sections were prepared.

To prepare frozen sections, the laminar samples were embedded with OCT compound (Tissue-Tek) after staining with the β -gal staining kit (Invitrogen). Then, 6 μ m sections were prepared using a cryostat, and counterstained using nucleofast red (Wako, 142-04331). To prepare paraffin sections, the laminar samples were stained with the β -gal staining kit and post-fixed with 10% formalin. Then, the samples were dehydrated with ethanol, permeabilized, embedded with paraffin, and cut into 4 μ m sections with a microtome.

As was in the cultured vascular cells and in human great saphenous veins described in above Examples, the transfection efficiency of

the vectors was increased in dose-dependent manner (Figure 13a), and reached a plateau with 2 min exposure (Figure 13b). The SeV vector achieved high transfection efficiency at lower concentrations as compared with adenovirus vector (Figure 13c).

5

[Example 10] Improved infectivity and transfection into media by protease treatment

To expand the potential use of the Paramyxovirus vector, protease pretreatment was applied to digest extracellular matrix (ECM), which
10 interferes with the vector transfection, especially into macrophages and smooth muscle cells, which are locating in the more inner area than endothelial cells. Macrophages and smooth muscle cells are the main factors causing post PTCA restenosis and arteriosclerosis. To determine which type of protease promotes transfection into media,
15 ECMs were treated with various proteases for 5 min before SeV vector was transfected. Since the transfer of enzyme is restricted to the vascular endothelial cells, protease that are capable of digesting basal lamina, and those used in clinical applications to blood vessels were mainly selected. The rat thoracic aorta was isolated and cut
20 into small pieces as in Example 9, and the segments were incubated at 37°C for 5 min in Hanks solution or 10% FBS (GIBCO BRL)-containing Hanks solution supplemented with the following protease: collagenase type 4 (ICN), 500 unit/ml; urokinase (COSMO BIO), 500 unit/ml; tPA (Calbiochem), 500 unit/ml; elastase (COSMO BIO), 500 unit/ml; plasmin
25 (COSMO BIO), 50 µg/ml; active-MMP2 (COSMO BIO), 100 ng/ml; active-MMP9 (COSMO BIO), 100 ng/ml. Solutions were pre-equilibrated to 37°C by warming at 37°C for 10 min. The segments were washed twice with Hanks solution, and immersed in Hanks solution containing GFP/SeV or SeV-NLS-lacZ at the indicated concentrations for 2 min. The segments
30 were washed twice with Hanks solution, and cultured in DMEM (GIBCO BRL) containing 10% FBS (GIBCO BRL) at 5% CO₂ in an incubator. After a day, the media was replaced, and the culture was continued for an additional day. Then, the segments were fixed and stained using the β-gal staining kit (Invitrogen). The staining time was 3 hr. After
35 the number of cells was counted, and the segments were post-fixed, frozen sections and paraffin-embedded sections were prepared as in

Example 9.

As shown in Figure 14, the infectivity was increased by 2- to 5-fold when SeV was infected at 1×10^7 pfu/ml with collagenase, urokinase, tPA, MMP9, MMP2, or elastase. Figure 15 represents the sections corresponding to the data shown in Figure 14. The examination revealed that pretreatment with collagenase, MMP2, and MMP9 enabled transfection even into the smooth muscle cells in arterial media. These protease are considered to have high activity because they digest basal lamina as a substrate, and particularly, MMP9 and MMP2 can digest a component of elastic fibers, elastin, as well. On the other hand, tPA alone did not achieve medial transfection, but, in combination with serum, tPA enabled transfection into media. This could be because plasminogen in the serum was digested into plasmin.

[Example 11] In vivo gene transfer of SeV into rat media by protease treatment

The effect of protease treatment on *in vivo* gene transfer was examined by introducing vectors into rat abdominal aorta and carotid artery (Figure 16). Arteries were pretreated with the protease that had promoted *ex vivo* transfection: collagenase type 4, MMP9, and MMP2, and also plasmin, in place of tPA plus 10% FBS (Figures 16a to d). For the carotid artery, protease and vector were mixed beforehand and administered taking into account of simplification of procedures for clinical application (Figures 16e and f).

For *in vivo* gene transfer into rat abdominal aorta using SeV vector, the rat was anesthetized with Nembutal and subjected to ventrotomy to expose the abdominal aorta. The abdominal aorta was clamped to stop blood flow. To prevent leakage, the branch vessels were also clamped. Twenty-five μ l of protease was injected into blood vessels using the insulin needle (TERMO). Proteases and their concentrations to be used were the same as used in the above *ex vivo* experiments. Protease treatment was performed by incubating at 37°C for 5 min with blood flow kept stopped using cotton sticks. The artery was washed with 50 μ l of saline using the insulin needle, similarly. Then, 25 μ l of SeV-NLS-lacZ (1×10^9 pfu/ml) was injected into the vessel, and incubation was continued for 2 min while shielding with cotton

sticks. Blood flow was reestablished by unclipping, and the vessel was reconnected. After 3 days, the rat was subjected to ventrotomy again, and the infected vessel was dissected and subjected to lacZ staining.

5 For *in vivo* gene transfer into rat carotid artery using SeV vector, the rat was anesthetized with Nembutal, and a pillow was put under the lower shoulder to stretch the lower jaw. The common carotid artery, internal carotid artery, and external carotid artery were detached, and all the branching was cut off. The external carotid artery was
10 tied at positions approximately 1 cm apart from the influx sites, and all the blood flow were blocked. The outer cylinder of 24-G elastase was inserted through the external carotid artery, and the lumen was washed extensively with heparin-containing saline. The catheter was fixed by thread. Ten μ l of protease solution was injected. After
15 5 min incubation, the vessel was washed with saline, and then 10 μ l of SeV-NLS-lacZ (1×10^9 pfu/ml) was injected. After 2 min incubation, the outer cylinder was removed, and the eye of the needle was tied at the center. Blood flow was reestablished and the vessel was reconnected. After 3 days, the rats were perfused with fixative
20 solution (saline containing 1% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde) subjected to ventrotomy again, and the injected area was dissected. The samples were subjected to LacZ staining with the β -galactosidase staining kit. For simultaneous administration, solutions separately containing equal amount of protease as described
25 above and SeV were prepared so that a desired final concentration would be obtained for each by mixing them. The solutions were prewarmed at 37°C for 10 min, mixed immediately before transfection, and exposed to the vessel. After 5-min immersion, the vessel was washed twice with Hanks solution. The following procedures were performed as
30 described in Example 9.

 In the untreated sample, SeV transfection was only found in endothelial cells, whereas in the samples pretreated with collagen type 4, MMP9, MMP2, or plasmin, the SeV gene transfer was found in the medial layer as well. For gene transfer into rat carotid artery,
35 the common carotid artery was used. In Figure 16f, after washed with saline, the sample was administered with 10 μ l of 1:1 mixture of

collagenase type 4 (final 500 unit/ml) and SeV-NLS-lacZ (final 1×10^9 pfu/ml). After 5 min, blood flow was reestablished. After 3 days, the injected vessels were dissected, fixed, and stained using the β -galactosidase staining kit. In the untreated sample, SeV transfection was only found in endothelial cells, whereas in the samples pretreated with the protease, SeV was transfected into the medial layer as well. Transfection into the medial layer was also achieved by simultaneous administration of protease and vector.

10 [Example 12] Ex vivo gene transfer of SeV into human great saphenous vein by protease treatment

Ex vivo gene transfer of SeV into neointima with the aid of protease pretreatment was performed using human great saphenous vein, which was provided from patients upon ablation surgery of the varix. Fat was removed from the thus-obtained great saphenous vein, and the vessel was cut into 1 cm x 1 cm laminar pieces and washed with Hanks solution. The sample was treated at 37°C for 5 min with protease-containing Hanks solution that had been prewarmed at 37°C for 10 min. After washed twice with Hanks solution, the sample was immersed in Hanks solution containing SeV-NLS-lacZ (5×10^8 pfu/ml) for 2 min. After washed twice with Hanks solution, the sample was cultured in DMEM (GIBCO BRL) containing 10% FBS in an incubator at 5% CO₂. After a day, the culture medium was replaced, and the culture was continued for an additional day before fixation and staining with the β -gal staining kit. The sample was stained for 3 hr. Then, the number of cells was counted, the sample was post-fixed, and paraffin sections was prepared.

As was the case in rat arteries, SeV transfection was only found in endothelial cells in the untreated sample (Figure 17a). In contrast, in the samples treated with MMP2 or plasmin, transfected cells were found in neointima under basal lamina as well (Figures 17b and c). All the proteases used in the experiments in rat were tested, and only MMP2 and plasmin showed significant effect. The reason might be that human great saphenous vein from patients of lower limb varix has an enlarged layer under basal lamina, whose structure is quite different from those of rat arteries. Additionally, it has different compositions of extracellular matrix and contains fibrin fibers.

Therefore, it is reasonable that plasmin, which can digest both basal lamina and fibrin, exhibited significant effect.

Industrial Applicability

5 The efficiency of transfection into the blood vessel has not
been at satisfactory level using conventional vectors. The use of
a Paramyxovirus vector of the present invention has enabled efficiently
transfecting genes into the vascular cells in short time. Thereby,
the present invention has provided a basic technology for gene therapies
10 such as those targeted at vascular cells.

CLAIMS

1. A method for transferring a nucleic acid into a vascular cell, said method comprising a step of contacting a recombinant Paramyxovirus vector or a cell comprising said vector with said vascular cell.
5
2. A method for transferring a nucleic acid into a vascular cell, said method comprising performing the following steps (a) and (b) sequentially or simultaneously:
10 (a) treating a tissue comprising a vascular cell with a protease, and
 (b) contacting a recombinant Paramyxovirus vector or a cell comprising said vector with said vascular cell.
- 15 3. The method according to claim 2, wherein said protease is selected from the group consisting of collagenase, urokinase, elastase, tissue plasminogen activator, plasmin, and matrix metalloproteinases.
- 20 4. The method according to any one of claims 1 to 3, wherein said nucleic acid contained in the recombinant Paramyxovirus vector comprises a foreign gene.
- 25 5. The method according to any one of claims 1 to 4, wherein said vascular cell is selected from the group consisting of an endothelial cell in a vascular lumen, an endothelial cell in a vasa vasorum (vessel wall nutrient vessel), a vascular smooth muscle cell in vascular media, and an adventitial cell.
- 30 6. The method according to any one of claims 1 to 5, wherein said Paramyxovirus is Sendai virus.
7. A recombinant Paramyxovirus vector that transfers a nucleic acid into a vascular cell.
- 35 8. The vector according to claim 7, wherein said Paramyxovirus is Sendai virus.

9. The vector according to claim 7 or 8, wherein said nucleic acid contained in the recombinant Paramyxovirus vector comprises a foreign gene.

5

10. The vector according to any one of claims 7 to 9, wherein said vascular cell is selected from the group consisting of an endothelial cell in a vascular lumen, an endothelial cell in a vasa vasorum (vessel wall nutrient vessel), a vascular smooth muscle cell in vascular media, and an adventitial cell.

10

11. A composition for gene transfer into a vascular cell, said composition comprising the recombinant Paramyxovirus vector according to any one of claims 7 to 10.

15

12. A kit for gene transfer into a vascular cell, said kit comprising the recombinant Paramyxovirus vector according to any one of claims 7 to 10 and a protease.

20

13. The kit according to claim 12, wherein said protease is selected from the group consisting of collagenase, urokinase, elastase, tissue plasminogen activator, plasmin, and matrix metalloproteinases.

ABSTRACT

Use of a recombinant Paramyxovirus vector has enabled transferring nucleic acid into the blood vessel at high efficiency by short exposure. The present invention provides a Paramyxovirus vector used for transferring nucleic acid into the vascular cells and a method for transferring nucleic acid using such vector. Pretreatment of blood vessels with protease significantly improved the efficiency of transfection into the medial layer. The expression of transfected genes was stable in the vascular cells for a long period. The method of the present invention enables efficiently transferring genes into tissues such as the blood vessel lumen, media, and adventitia in short time in such applications as gene therapy.